

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-515216
(P2001-515216A)

(43) 公表日 平成13年9月18日 (2001.9.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 31/20		G 0 1 N 31/20	2 G 0 4 2
B 0 1 D 15/08		B 0 1 D 15/08	4 C 0 5 7
B 0 1 J 19/00		B 0 1 J 19/00	B 4 D 0 1 7
B 0 1 L 3/00		B 0 1 L 3/00	4 G 0 5 7
	7/00	7/00	4 G 0 7 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 78 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-509721(P2000-509721)
 (86) (22) 出願日 平成10年8月13日(1998.8.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年2月14日(2000.2.14)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 6 8 7 0
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 0 9 0 4 2
 (87) 国際公開日 平成11年2月25日(1999.2.25)
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 9 1 0 , 4 3 4
 (32) 優先日 平成9年8月13日(1997.8.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 1 1 5 , 4 5 4
 (32) 優先日 平成10年7月14日(1998.7.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 シーフィード
 アメリカ合衆国94089カリフォルニア州サ
 ニーベイル、ボアガス・アベニュー1190番
 (72) 発明者 リー・アラン・クリステル
 アメリカ合衆国95306カリフォルニア州パ
 ロ・アルト、ラ・ドンナ・ストリート3747
 番
 (72) 発明者 グレゴリー・ティ・エイ・コバクス
 アメリカ合衆国94305カリフォルニア州ス
 タンフォード、ピーター・クーツ・サーク
 ル105番
 (74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 流体試料を操作するための微小構造体

(57) 【要約】

本発明は、流体試料中の核酸のような所望の物質をその他の物質から分離するための微小流体装置と方法である。好ましい実施形態では、装置は超微細加工されたチップ(20)を備える。チップは、入口ポート(28)と出口ポート(30)と、これらのポートと流体で連通する抽出チャンバ(26)とを有する。チャンバ(26)は、流体試料がチャンバに連続的に流れるときに流体試料から所望の物質を捕獲する内部吸着表面を有する。次に、溶離溶液をチャンバ(26)に強制的に流すことによって、捕獲された上記物質は溶離され、従って上記物質は内表面から溶離溶液の中に放出される。装置の貫流設計により、標的物質を比較的大きな容積の流体試料から遥かに小さな容積の溶離溶液中に濃縮させることができる。内部表面は、好ましくは、コラム(32)の配列によって形成され、コラム(32)はチャンバ(26)の壁と一体に形成されると共にチャンバ(26)の中に伸びている。コラム(32)は大きな表面積を提供して所望の物質を捕獲する。この装置は、また、好ましくは一体型のヒーターを含んで溶離効率を増大さ

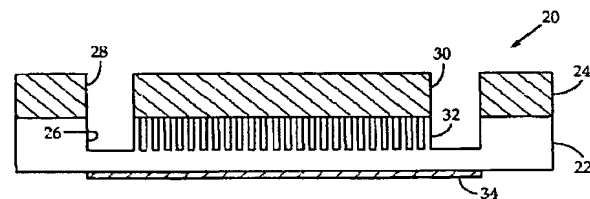


FIG. 6

【特許請求の範囲】

【請求項1】 流体試料中の所望の物質を他の物質から分離するための貫流装置において、

- a) 上記流体試料を上記本体に導入するための入口ポートと、
- b) 上記本体から上記流体試料を出すための出口ポートと
- c) 上記試料が上記本体を流れるとき上記流体試料から上記所望の物質を抽出するための上記入口ポートと上記出口ポートとを流体で連通している抽出チャンバとを中に形成した本体を備え、

上記入口ポートと上記出口ポートとは上記流体が上記抽出チャンバを通して連続的に流れることができるように配置され、上記チャンバは上記本体の内部表面によって形成され、上記内部表面の少なくとも1つは、上記流体試料が上記チャンバを流れるときに上記所望の物質を捕獲するために、十分に広い表面積と上記所望の物質に対して十分に高い結合親和力とを有していることを特徴とする装置。

【請求項2】 請求項1に記載の装置において、上記内部表面は、上記抽出チャンバの少なくとも1つの壁と一体に形成されて上記チャンバの中に延在する内部微小構造体の表面を備えていることを特徴とする装置。

【請求項3】 請求項2に記載の装置において、上記内部構造体は高アスペクト比のコラムの配列を備えていることを特徴とする装置。

【請求項4】 請求項2に記載の装置において、上記列は、上記内部構造体は列になって配置されていると共に、各列の上記微小構造体が隣接する列の上記部小構造体と一直線上に並ばないように配置されていることを特徴とする装置。

【請求項5】 請求項4に記載の装置において、上記列は、各列の上記微小構造体が少なくとも2つ前の列または後の列の上記部小構造体と一直線上に並ばないように配置されていることを特徴とする装置。

【請求項6】 請求項2に記載の装置において、上記微小構造体の各々は、少なくとも4:1の断面長さとの幅の比を有していることを特徴とする装置。

【請求項7】 請求項1に記載の装置において、上記所望の物質は、有機体と細胞とプロテインと核酸と炭水化物とウィルス粒子とバクテリアと化学薬品と

生化学製品とから成るグループから選択されることを特徴とする装置。

【請求項 8】 請求項 1 に記載の装置において、内部表面の少なくとも 1 つは、上記所望の物質の捕獲を促進するために上記所望の物質と結合親和力を持つ材料で被覆されていることを特徴とする装置。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の装置において、上記材料は、シリコンと二酸化けい素とポリマーと核酸と金属とポリペプチドとプロテインと多糖類とから成るグループから選択されることを特徴とする装置。

【請求項 10】 請求項 1 に記載の装置において、上記抽出チャンバを加熱するためのヒーターを備えていることを特徴とする装置。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の装置において、上記ヒーターは、上記チャンバの少なくとも 1 つの壁に結合された抵抗型加熱要素を備えていることを特徴とする装置。

【請求項 12】 請求項 10 に記載の装置において、上記ヒーターは、上記チャンバを形成している上記本体の少なくとも一部分に電位差を印加するための電極を備えていることを特徴とする装置。

【請求項 13】 請求項 10 に記載の装置において、上記ヒーターの作動を制御するためのプロセッシングエレクトロニクスをさらに備えていることを特徴とする装置。

【請求項 14】 請求項 1 に記載の装置において、上記装置は上記流体試料のための前処理サイトを有するカートリッジと結合し、且つ、上記装置は上記カートリッジに挿入されて上記入口ポートが上記前処理サイトと流体で連通するように作られていることを特徴とする装置。

【請求項 15】 請求項 1 に記載の装置において、上記装置は溶離物質のための後処理サイトを有するカートリッジと結合し、且つ、上記装置は上記カートリッジに挿入されて上記出口ポートが上記後処理サイトと流体で連通するように作られていることを特徴とする装置。

【請求項 16】 流体試料中の所望の物質を他の物質から分離する方法において、

a) 入口ポートと出口ポートと上記入口ポートおよび上記出口ポートに流体で連

通している抽出チャンバとを有する本体を備える貫流装置を設けるステップを備えて、上記抽出チャンバは上記本体の内部表面によって形成され、上記内部表面は十分に大きな表面積と上記所望の物質に対して十分に高い結合親和力を有して、上記流体試料が上記チャンバを流れるときに上記物質を捕獲し、

b) 上記流体試料を上記チャンバに連続的に強いて流すステップを備え、これによって上記流体試料が上記チャンバを流れるときに上記所望の物質を上記内部表面に結合させ、

c) 溶離流体を上記チャンバに強いて流すことによって上記装置から上記所望の物質を溶離するステップを備え、これによって上記物質を上記内部表面から上記溶離流体に放出させることを特徴とする方法。

【請求項17】 請求項16に記載の方法において、上記所望の物質は、有機体と細胞とプロテインと核酸と炭水化物とウィルス粒子とバクテリアと化学薬品と生化学製品とから成るグループから選択されることを特徴とする方法。

【請求項18】 請求項16に記載の方法において、上記チャンバに強いて流す上記流体試料の容積は上記チャンバの最大収容容積よりも大きいことを特徴とする方法。

【請求項19】 請求項16に記載の方法において、上記物質を溶離する上記ステップは、上記溶離流体を上記チャンバに強いて流す間上記内部表面を加熱するステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項16に記載の方法において、上記溶離流体を上記チャンバに強いて流すステップの前に、ガスを上記チャンバに強いて流すステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項21】 請求項16に記載の方法において、上記流体試料が上記チャンバに流れるとき、上記流体試料が溶解試薬に接触するステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項22】 請求項16に記載の方法において、上記内部表面は、上記抽出チャンバの少なくとも1つの壁と一体に形成された内部微小構造体の表面を備えていることを特徴とする方法。

【請求項23】 請求項22に記載の方法において、上記微小構造体は上記

チャンバの中に延在するコラムを備え、且つ、上記流体試料を上記チャンバに強いて流すステップは上記流体試料を上記コラムの間に強いて流すステップを備えていることを特徴とする方法。

【請求項24】 請求項16に記載の方法において、上記所望の物質の捕獲を促進するために上記流体試料を上記チャンバに強いて流す間、上記本体と上記流体試料との間に電位差を印加するステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項25】 流体試料中の所望の物質を他の物質から分離するための貫流装置において、

a) 極微製作されたチップであって、その中に

i) 上記流体試料をチップに導入するための入口ポートと、

ii) 上記流体試料を上記チップから出すための出口ポートと、

iii) 上記流体試料が上記チップを流れるとき上記流体試料から上記所望の物質を抽出するための抽出チャンバとを有し、

上記抽出チャンバは上記入口ポートと上記出口ポートとに流体で連通し、且つ、上記入口ポートと上記出口ポートとは上記流体が上記抽出チャンバを通して連続的に流れることができるように配置されたチップと、

b) 上記抽出チャンバを加熱するためのヒーターと、

c) 上記流体試料が上記チャンバに連続的に流れるときに上記所望の物質を捕獲するための上記捕獲チャンバの中に入れられた少なくとも1つの固形支持体とを備えていることを特徴とする装置。

【請求項26】 請求項25に記載の装置において、上記固形支持体は、ビードとファイバと膜とグラスウールとフィルタペーパーとゲルとから成るグループから選択された支持物を備えていることを特徴とする装置。

【請求項27】 請求項25に記載の装置において、上記所望の物質は、有機体と細胞とプロテインと核酸と炭水化物とウィルス粒子とバクテリアと化学薬品と生化学製品とから成るグループから選択されることを特徴とする装置。

【請求項28】 請求項25に記載の装置において、上記ヒーターは、上記チャンバの少なくとも1つの壁に結合された抵抗型加熱要素を備えていることを

特徴とする装置。

【請求項29】 請求項25に記載の装置において、上記ヒーターは、上記チャンバを形成している上記チップの少なくとも一部分に電位差を印加するための電極を備えていることを特徴とする装置。

【請求項30】 請求項25に記載の装置において、上記ヒーターの作動を制御するためのプロセッシングエレクトロニクスをさらに備えていることを特徴とする装置。

【請求項31】 請求項25に記載の装置において、上記装置は上記流体試料のための前処理サイトを有するカートリッジと結合し、且つ、上記装置は上記カートリッジに挿入されて上記入口ポートが上記前処理サイトと流体で連通するように作られていることを特徴とする装置。

【請求項32】 請求項25に記載の装置において、上記装置は溶離物質のための後処理サイトを有するカートリッジと結合し、且つ、上記装置は上記カートリッジに挿入されて上記出口ポートが上記後処理サイトと流体で連通するように作られていることを特徴とする装置。

【請求項33】 流体試料中の所望の物質を他の物質から分離するための方法において、

- a) 入口ポートと出口ポートと上記入口ポートおよび上記出口ポートに流体で連通している抽出チャンバとを中に形成したチップを設けるステップを備えて、上記入口ポートと上記出口ポートとは上記流体試料を上記チャンバに連続的に流せるように配置され、且つ、上記抽出チャンバは上記流体試料が上記チャンバを流れるときに上記所望の物質を捕獲するための少なくとも1つの固形支持物を含み、
- b) 上記流体試料を上記チャンバに連続的に強いて流すステップを備え、これによって上記流体試料が上記チャンバを流れるときに上記所望の物質を上記内部表面に結合させ、
- c) 上記チャンバを加熱することによって上記所望の物質を上記チップから溶離し、且つ、溶離流体を上記チャンバに強いて流すステップを備え、これによって上記物質を上記固形支持物から上記溶離流体に放出させることを特徴とする方法

【請求項34】 請求項33に記載の方法において、上記所望の物質は、有機体と細胞とプロテインと核酸と炭水化物とウィルス粒子とバクテリアと化学薬品と生化学製品とから成るグループから選択されることを特徴とする方法。

【請求項35】 請求項33に記載の方法において、上記チャンバに強いて流す上記流体試料の容積は上記チャンバの最大収容容積よりも大きいことを特徴とする方法。

【請求項36】 請求項33に記載の方法において、上記溶離流体を上記チャンバに強いて流すステップの前に、ガスを上記抽出チャンバに強いて流すステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項37】 請求項33に記載の方法において、上記流体試料が上記チャンバに流れるとき、上記流体試料が溶解試薬に接触するステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項38】 流体を操作するための装置であって、
少なくとも第1流体と第2流体とをそれぞれ通す第1溝と第2溝とを中に形成した基板を備え、上記第1溝と上記第2溝はこれらの流体流の接触領域を提供する共通溝に合流し、上記共通溝はその外面表面積の3倍以上の内部表面積を有して上記流体流の間に大きな界面面積を提供することを特徴とする装置。

【請求項39】 請求項38に記載の装置において、上記共通溝に配置されたピラーをさらに備えて上記流体流の安定性を増大させていることを特徴とする装置。

【請求項40】 請求項38に記載の装置において、上記第1溝と上記第2溝とは複数の共通溝に合流して、対応した複数の接触領域を上記流体流に対して提供することを特徴とする装置。

【請求項41】 請求項38に記載の装置において、上記接触領域から離れて上記共通溝と流体で連通している第3溝と第4溝とをさらに備えて、上記第1流体流と上記第2流体流とをそれぞれ通すことを特徴とする装置。

【請求項42】 流体を操作するための装置であって、
a) 第1流体流を通すための第1溝と、

b) 上記第1溝と流体で連通し、且つ、上記第1流体流を第2流体流と第3流体流とに分離するために上記第1溝から分岐している第2溝と第3溝とを中に形成した基板を備え、

上記溝の各々はその外面表面積の3倍以上の内部表面積を有して上記流体流の間に大きな界面面積を提供することを特徴とする装置。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

(関連出願情報)

この出願は、1997年8月13日に出願された米国出願番号第08／910,434号および1998年7月14日に出願された米国出願番号第09／115,454号から優先権を請求する。

【 0 0 0 2 】

(技術分野)

本発明は一般に流体試料の処理に関し、特に、流体試料中のプロテインとか核酸とかその他の複合分子成分のような巨大分子を含む物質を操作するための新しい方法と微小流体装置に関する。

【 0 0 0 3 】

(本発明の背景)

分子生物学および生物医学診断学の多くの分野において、生物学的試料から核酸などの標的物質を抽出し、分離し、濃縮するための有効な方法と技法に対して大きなニーズが存在する。これらの分野に関する実例は、食物、水、血液、生物組織、喀出物質、尿、産業流体および土壌といった医学的、工業的、環境的な容積の大きい試料の処理を含んでいる。これらの試料は、遺伝子分析のために使用される。遺伝子分析には、例えば、配列、病原体の識別と定量化、核酸の突然変異分析、ゲノム分析、移植に対する器官の適合性の評価、遺伝子発現の調査、薬理学的モニタリング、新薬発見のためのDNAライブラリーの創生と検証などがある。

【 0 0 0 4 】

流体試料から核酸を抽出するための従来のベンチトップ技法は、試料を攪乱塩（カオトロピズム塩）およびシリカ粒子と混合する。シリカ粒子としては例えばガラスまたは珪藻土の粒子がある。この技法は、ブームらの米国特許第5,234,809号と、ギレスピーらの米国特許第5,155,018号とに記載されている。DNA、RNA、および多くのプロテインは自然にシリカの表面に付着し結合する。攪乱剤は、試料中の細胞の溶解を引き起こし、核酸のシリカへの結合

を増大させる。また、これによって、シリカへの付着を抑制するプロテインを変性させる。また、これらの塩は、DNAとRNAの二次構造を和らげ、従ってそれらの付着に対して良好な化学的環境を与える。

【 0 0 0 5 】

核酸を含む試料は、核酸をあらゆる表面に付着させるように、例えば振動によって流体試料に乱れを起こして、シリカの粒子と混合される。核酸がシリカ粒子へ付着することによって、シリカ核酸ペレットが形成される。次に、これらのペレットは、典型的には遠心分離と、例えば吸引などによる上清の処分とによって、流体から物理的に分離される。次に、ペレットは、汚染物質を除去するために例えばヴォルテックスミキサー（渦巻型混合機）を使用して洗浄され、再び沈殿される。また、付加的な洗浄処置が数回行なわれる。最終的に、水性溶液の緩衝剤を使用して、核酸はペレットから溶離される。これらの処置は、典型的には、例えば1.5 mLの円錐管のような標準反応容器を使用して、作業台上（ベンチトップ）で手作業で行なわれる。

【 0 0 0 6 】

核酸を分離し純化するためのもう1つのベンチトップ技法は、結合マトリックスとしてヒドロキシル化されたシリカを使用する。この技法は、ウッダードらの米国特許第5,693,785号に記載されている。上記のヒドロキシル化されたシリカによって、核酸は、攪乱剤を使用しなくても、室温の水性溶液中で結合する。この方法によると、DNAを含有する溶液は、ヒドロキシル化されたシリカと共に保温されて、DNAの結合が行なわれる。次に、この混合物は遠心分離されて、結合されたDNAと上記ヒドロキシル化されたシリカのペレットが得られる。次に、上記ペレットを溶離溶液中で再懸濁して、典型的には37度CのDNAにとって破壊的でない温度に加熱することによって、DNAは上記ヒドロキシル化されたシリカから溶離する。

【 0 0 0 7 】

従来のベンチトップ測定技法に代るものとして、自動化された微小流体装置を開発するという試みがなされて来ており、上記装置は試料準備機能と試料処理機能の内の幾らかをこなす。微小流体システムは、ベンチトップ測定と比較して、

軽便性、再生産性の向上、汚染の減少、試薬消費の減少、操作者介在の減少、低測定コストという可能性を持っている。マイクロ機械加工の技術は、例えば半導体基板を使用して、微小流体装置の製造を可能にし、マイクロリットルからピコリットルの容積の試料を操作したり、反応させたり、検知したりすることができる。例えば、ノースロップらの米国特許第 5,639,423 号は、生物化学反応を行なうための超微細製作された反応器を、特にポリメラーゼ連鎖反応のような DNA ベースの反応を行なうための反応器を開示している。

【 0 0 0 8 】

しかしながら、微小流体技術における進歩にも拘わらず、比較的大きな容積の流体試料から核酸を有効に抽出でき、且つ、次の分析処理のために核酸を小さな容積に濃縮できる微小流体装置のニーズが相変わらずある。特に診断への適用においては、例えば病原性器官または癌細胞など、数ミリリットル以上の比較的大きな容積の試料から低濃度の核酸を抽出し濃縮することが頻繁に必要なになる。この種の処置は、例えば、食物中の有毒大腸菌 0157（食物 10 グラム当たり 1 生物体のレベルで有毒）、血液中の HIV（血液 1 ミリリットル当たり 200 ウィルス生物体以下）、細菌戦シナリオ中の炭疽菌（空気 1 リットル当たり 100 生物体以下）、血液又は尿中の癌細胞（流体 1 ミリリットル当たり 10 細胞以下）、性病（例えば淋病やクラミジア）の尿中の病原体（流体 1 ミリリットル当たり 100 生物体以下）の検出に必要なとなる。

【 0 0 0 9 】

核酸を抽出し分析するための現存する微小流体装置は、残念ながら、ピコリットルやナノリットルやマイクロリットルの試料容積に焦点が集まっている。例えば、アンダーソンらは、「微小流体生化学分析システム」（“Microfluidic Biochemical Analysis System”, Transducers '97, 1997 International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Chicago, June 16-19, 1997, pg.477-480）と題する記事に試料準備と試料分析のための微小流体装置を開示している。

【 0 0 1 0 】

アンダーソンによって開示された装置は 5 から 20 のマイクロリットルのチャ

ンバを含んでいて、チャンバには、流体試料から核酸を分離するためのガラス壁がある。操作に際して、まず、使用者は流体試料を攪乱塩と混合して、DNAを放出する。それから、溶解試料がチャンバ内に注入され、10～20分間保温されて、流体試料の中の核酸をガラス壁に結合させる。次に、流体試料はチャンバから排出され、チャンバは数回洗浄されて汚染物質を除く。最後に、チャンバを溶離溶液で満たし50度Cで20分間保温することによって、核酸がチャンバから溶離される。

【 0 0 1 1 】

その他の現存する微小流体装置は、流体試料から核酸を分離するための電気泳動法に依っている。このような装置は、一般に、分離溝を含んでいるか、あるいはチャンバの対向面に電極を配置したチャンバを含んでいる。また、チャンバは典型的には、フィルタや膜などの適当な障壁を含んでいて、障壁は電流の通路となるが、核酸やその他の巨大分子を通さないように配慮されている。適当な電場を与えると、試料中に存在する核酸は、正電極に向かって移動し、膜上に捕らえられる。膜を免れて残留する試料不純物は、続いて、チャンバから洗い流される。電圧を反転させると、核酸が膜からきれいに放出される。このような核酸を純化するための微小流体装置は、アンダーソンらによる1997年1月23日に発行された国際公開番号第WO97/02357号に記載され、また、シェルドンらによる1998年3月12日に発行された国際公開番号WO98/10277号に記載されている。

【 0 0 1 2 】

上記微小流体装置の主な欠点は、微小流体装置が流体試料から核酸を抽出するには効率が比較的悪く、比較的大きな容積の流体試料から小さな容積の溶離流体中に、核酸が迅速かつ効果的に濃縮されないことである。特に、現存する上記微小流体装置は、限定され定められた量の流体試料がチャンバに保持されて保温または電気泳動される巨塊処理のアプローチに限定されている。その結果、このような装置によって処理され得る流体の容積は、チャンバの最大収容容積に限定され、典型的には、ピコリットル、ナノリットル、マイクロリットルの量になる。

【 0 0 1 3 】

このような小さい試料容積は、現実の数多くの診断に適用するのには、実用的でない。特に、DNAのような低コピーの核酸を検出するには、正確に検出するために、数ミリリットル以上の試料容積が必要である。現存の微小流体装置は、典型的にはピコリットル、ナノリットル、マイクロリットルの処理量に限定されるので、多くの核酸に関係する診断に適用するには有効でない。勿論、1つの可能なアプローチとしては、大きな容積の流体試料を収容するために大きな装置を作ることである。しかしながら、もしもこの装置が集積回路チップの技術を用いて製作されるならば、超微細に製作される装置は、低濃度の核酸を検出するのに必要な試料容積を収容するために、非常に大きいものでなければならない。このように大きなチップは、高価であるばかりでなく、小型化するという目的に反し、特に多種類の使い捨て型医学診断用途あるいは環境診断用途には沿わない。

【 0 0 1 4 】

(本発明の目的と利点)

したがって、流体試料中の所望の物質をその他の物質から有効に抽出し、且つ、所望の物質が高度に濃縮された溶離液を提供するための微小流体装置と方法を提供することが本発明の目的である。特に、核酸を比較的大きな容積の流体試料から分離でき、且つ、核酸を濃縮してずっと小さな容積の溶離流体にできる貫流装置を提供することが本発明の目的である。抽出プロセスと溶離プロセスの効率を増大させるために一体型のヒーターを持つ装置を提供することが、本発明の更なる目的である。

【 0 0 1 5 】

本発明のこれらの目的と利点およびその他の目的と利点は、次の説明と添付の図面を顧慮すると明らかである。

【 0 0 1 6 】

(概要)

本発明は、流体試料を操作するための新規な方法と装置とを提供する。本発明の例示的使用は、流体試料中の核酸のような所望の物質をその他の物質から分離するためであり、且つ、所望の物質の高度に濃縮された溶離液を提供するためである。所望の物質は、例えば、核酸または標的細胞または有機体または細胞また

はプロテインまたは核酸または炭水化物またはウィルス粒子またはバクテリアまたは化学薬品または生化学製品である。

【 0 0 1 7 】

第1の実施形態によると、装置は本体を、好ましくは超微細機械加工されたチップを備え、その中に形成された上記流体試料を上記本体に導入するための入口ポートと、上記本体から上記流体試料を出すための出口ポートと、上記試料が上記本体を流れるとき上記流体試料から上記所望の物質を抽出するための上記入口ポートと上記出口ポートとを流体で連通している抽出チャンバとを備える。上記入口ポートと上記出口ポートとは、上記流体が上記抽出チャンバを通して連続的に流れることができるように配置される。上記チャンバは、十分に広い表面積と上記所望の物質に対して、例えば核酸に対して十分に高い結合親和力とを有する内部吸着表面を持っていて、上記流体試料が上記チャンバを流れるときに上記所望の物質例えば核酸を捕獲する。

【 0 0 1 8 】

流体試料中の所望の物質をその他の物質から分離するため、装置を使用する好ましい方法は、流体試料をチャンバに連続的に強いて流すステップを含み、これによって流体試料がチャンバを流れるときに所望の物質をチャンバの内部表面に結合させる。流体試料は、例えば、ポンプ、電気浸透力、電気泳動力、空気圧、真空あるいは重力といった何か適当な流体起動源を使用して、チャンバに強制的に流される。次に、溶離流体をチャンバに流すことによって、捕獲された物質が装置から溶離され、したがって物質が内部表面から溶離流体に放出される。

【 0 0 1 9 】

従来技法とは対照的に、チャンバに流される流体試料の容積は、好ましくは、チャンバの容量容量よりも大きい。特に、本発明の貫流装置は、例えば数ミリリットル以上の比較的大容積の流体試料の標的物質を、例えば25マイクロリットル以下のずっと小さな容積の溶離流体に濃縮させることができる。10から100の並外れた濃縮係数が容易に達成される。また、装置は、好ましくは、チャンバを加熱するために、例えば抽出チャンバの壁に繋がれた抵抗器のようなヒーターを含む。チャンバの加熱は、溶離効率を向上させ、また、所望の物質の捕獲を

促進するために随意に使用される。

【 0 0 2 0 】

好ましい実施形態では、所望の物質を捕獲するための内部吸着表面は、内部微小構造体の配列によって形成される。内部微小構造体は、好ましくは、高いアスペクト比を持ち、抽出チャンバの少なくとも1つの壁に一体に形成され、チャンバの中に伸びる。高アスペクト比のコラムは大きな表面積を与え、この大きな表面積に所望の物質が結合する。したがって、流体試料がチャンバを静かにすなわち層流で流れて、物質の有効な抽出が生じる。したがって、微小構造体は、簡単な一段抽出処理を可能にする。対照的に、従来の技法は、二段抽出処理を必要とする。この処理では、流体試料とシリカ粒子とが、まず、振動などによって乱流を作って混合され、次に、遠心分離のような技法によって物理的に分離される。本発明の微小構造体は、チャンバから流体へ非常に有効な熱的界面を提供する。

【 0 0 2 1 】

好ましくは、流体がチャンバを流れる際に流体とコラム表面の相互作用が最小となる配列に、コラムは配置される。好ましい実施形態では、コラムは列をなし、一列に並んだコラムは、各々隣接する一列に並んだコラムから一定の距離だけ間隔を開けて配置される。さらに、好ましくは、隣接する列は、各列のコラムが隣接するコラムに対して僅かでも一直線上に並ばないように、互いにオフセットして（ずらして）配置される。さらに、好ましい実施形態では、各列のコラムが少なくとも2つ前の列あるいは2つ後の列と一直線上に並ばないように、列が配置される。この非同一一直線上配列は連続する列のパターンに適用されて、チャンバは1つのパターンまたは繰返しパターンを含んでいる。例えば、このパターンは3列毎ないし10列毎に繰返される。代替えとして、コラムの非同一一直線上配列は、列から列へ無作為なものであってもよい。列のこのオフセットは、流体流を細分化することによって、流体とコラム表面との相互作用を増大させる。この流体流の細分化は、流体が抽出チャンバを流れるときに流れのあらゆる部分がコラムの非常に短い間隔の中に入って来て起こる。

【 0 0 2 2 】

代替えの実施形態では、内部吸着表面は、抽出チャンバ内に收容された固形支

持体によって形成される。標的物質を捕獲するのに適した固形支持体は、例えば、ビードとファイバと膜とグラスウールとフィルタペーパーとゲルとを含む。

【 0 0 2 3 】

所望の物質の効果的な捕獲を確実にするために、チャンバの1つ以上の内部表面が、上記物質と高い結合親和力を持つ材料で被覆される。適した材料としては、例えば、シリコン、二酸化けい素のようなシリコン誘導体、ポリマー、ポリアミドのようなポリマー誘導体、核酸、或る種の金属、ポリペプチド、プロテイン、多糖類、または所望の物質と高い結合親和力を持つ他の物質がある。

【 0 0 2 4 】

本発明の装置は、好ましくは、カートリッジとの組み合わせで使用され、上記カートリッジは流体試料のための前処理サイトおよび/または溶離された核酸のための後処理サイトを持つ。一例として、流体試料を前処理するために、前処理サイトは細胞溶解領域と析出領域と純化領域とを備え、後処理サイトは、毛細管電気泳動領域と等電点電気泳動領域と核酸拡大領域と交雑形成領域と溶離材料の交雑形成領域の配列とを備えている。これらの実施形態では、入口ポートが前処理サイトと流体連通し、および/または出口ポートが後処理サイトと流体連通するようにして、装置はカートリッジの中に挿入される。

【 0 0 2 5 】

カートリッジは、流体試料を抽出チャンバに強制的に流すために、ポンプや空気圧源や吸引装置のような1以上の流体起動源を随意に含むかあるいは結合される。カートリッジは、カートリッジの操作を制御するために、例えば1つ以上のマイクロプロセッサとマルチプレキサと電力制御回路とセンサー回路を有するプロセッシングエレクトロニクスを含むか或いは結合される。

【 0 0 2 6 】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明は、流体を微小規模で制御し、移動させ、或いは逆に手作業で操作するという状況を扱う。十分に自動化された生化学的分析に有用な微小流体システムは、微小流体回路に組み込まれるならば、容積測定や流体混合や加熱あるいは液相分離などの特定の機能性を必要とする。それら微小流体システムは、従来の巨

視的な設計のアプローチを無効にする例えば低レイノルズ数のような微小スケールな影響を克服するべく設計されねばならない。

【 0 0 2 7 】

流体の混合は、殆どの生化学分析的な詳細計画（プロトコル）において、共通且つ重大な事象である。従来の巨視的規模では、2つ以上の流体の混合を行なうために、ピペットや渦巻装置や吸引／分配ロボット工学を含めて、様々な有効な手段が存在する。しかしながら、微小流体システムでは、流体の混合が困難であることは周知のことである。この問題は、殆どの微小流体システムにおいて、レイノルズ数が一般に非常に小さく（100未満）、流れが実質的に常に層状であるという事実から生じている。レイノルズ数は、密度×速度×溝幅／粘度である。微小流体システムでは、溝幅が非常に小さいので、レイノルズ数は小さい。巨視的なシステムでは、乱流が始まる前は、レイノルズ数は約2300以上であるに違いない。微小流体システムでは、流体流が実質的に決して乱流とならないので、混合はほぼ完全に拡散によって起こる。拡散による混合は非常に遅い場合がある。一例としては、深さが300 μ m、幅が600 μ mの「ジグザグ」溝がある。この溝は100mmの流長のみで流体を完全に混合させる。

【 0 0 2 8 】

生物化学分析では、混合以外に、他の手法が必要である。例えば、生物学的化合物を含んだ水性溶液からプロテインおよびその他の疎水性の化学物質を抽出する方法として広く容認された方法は、液相分離である。プロテインは、通常、漿液や原形質（プラズマ）や組織ホモジェネートなどの水性生物溶液において高濃度で存在し、構造的には疎水性ドメインと親水性ドメインとから成っている。疎水性ドメインと親水性ドメインとは、共に、それらを分解する溶媒の機能として2次構造と3次構造を決定する。通常、疎水性ドメインは親水性ドメインよりもはるかに大きい。疎水性ドメインが球形構造の芯部に自己結合し、親水性ドメインが溶媒に晒されるとき、極性のある溶媒内で安定な構造が得られる。これが、溶媒特性の関数として折り畳まれた構造と折り畳まれていない構造との間のギブス自由エネルギー状態の差を満たす。しかしながら、状態は水性の相において作り出され得て、殆どの場合、極端な塩分濃度やpHあるいは変性剤または洗浄

剤の存在によってもっぱら限定されるが、プロテインに対する低いギブス自由エネルギー状態は、例えばアルコールや種々のアルカンやクロロホルムのような非極性溶媒において達成され得る。

【 0 0 2 9 】

極性ベースの生物試料からプロテインを抽出するために、プロテインの選択的な分割、極性溶媒から非極性溶媒へのプロテインの移動または拡散が使用される。例えばクロロホルムのような非極性の液体が、水ベースの溶液に加えられたとき、これらの流体（液体）は混り合うことなく、混合することのない2つの相に分かれたままとなる。より密度の希薄な非極性相が上昇し、極性相の上面の上に分離層として留まる。極性相内の少数のプロテインは、3次構造において変化が生じて、それらは、非極性相での溶解に伴う低エネルギー状態を好むがために、2相間の境界を横切る。非常に長期間に渡ると、極性相にはプロテインが存在しなくなる。混合しあうことのない流体が勢いよく掻き回されると、溶液はエマルジョン（乳濁液）となる。このようなエマルジョンの中では、非極性相が多数の小さな液滴を形成する。これらの液滴は極性相によって包囲され、極性相の隅々まで等しく分配されている。これは、プロテインの非極性相との相互作用およびプロテインの非極性相への拡散に対して、2相間の有効表面積を劇的に増加させる。プロテインの非極性相への移動速度は、極性相の構造的な安定性を低下させるという極性相内の条件を変化させることによって、高めることができる。高塩分濃度、洗浄剤、フェノールおよび／または錯乱剤の存在は、極性相におけるプロテインの折り畳まれた状態の安定性を減少させることができる。

【 0 0 3 0 】

エマルジョンを掻き回すことなくしばらく静かに放置した後には、或いは（2つの相の間に密度の違いが存在するなら）相対的に増大された遠心力の補助を用いると、2相は終いに再び分離し、非極性相が極性相の上面の上に層を形成する。そして、非極性相はプロテインでもって高度に濃縮され、極性相はプロテインがなくなる。プロテインの元の濃度が非常に高い場合、残留プロテインは戻り拡散のために極性相の中に尚も存在し得る。したがって、新たな非極性相の溶媒が加えられて、分離が繰返される。同じような相分離方法は、水ベースの生物学的

溶液からプロテインを分離するために多年に渡って使用されている。

【 0 0 3 1 】

本発明は、流体を迅速かつ有効に混合したり、従来の攪拌ベースの液相分離法と同じプロテイン抽出機能を行なうための手段を与える人工のエマルジョンを作ったりするのに有用な非常に大きな微小流体界面を産出するのに適した微小装置を提供する。流体の効率的な混合ができる構造とするために、超超微細機械加工された微小流体溝を作るために、新しいプロセス技術が利用できるようになって来ている。深部反応イオンエッチング (D R I E) として知られた方法によって、非常に深く、然も驚くほど狭い溝の形成が可能である。迅速な拡散混合は、このプロセスを用いて、深く垂直な溝に2つの流体を流し、そらを一緒に合流させることによって実現される。これによって2つの薄い垂直のシース (鞘状部) ができ、これらのシースは従来型の溝よりもずっと短い距離の拡散によって混合する。D R I E プロセスを利用した微小溝構造が、液相分離プロセスを支援するべく設計される。図1～5に示されているように、流体溝は固体の基板に様々な外面形態で形成される。図2は、2つの深い溝70, 72が1つの共通溝74に合流する装置を示す。溝は、D R I E を用いて、シリコン基板をエッチングして作られる。各溝は、その幅75よりも大きな深さ73を持ち、3 : 1 よりも大きな表面積比を提供する。分離された溝70, 72を流れる流体は、共通溝74で合流して2つの並流する薄い流体シースを形成する。幅に対して深くなった溝は、2つの流体が拡散混合するために、流対流の間に大きな界面領域を提供する。図1Eは、6つの深い溝が単一の共通溝に合流する同種の装置の走査型電子顕微鏡写真である。別々の溝を通る流体は、共通溝において合流して6つの並流する流体シースを形成する。

【 0 0 3 2 】

図3は、2つの非混合性流体流 (極性溶媒と非極性溶媒) を通すための2つの深溝70, 72を持つもう1つの装置を示す。溝70, 72とは、接触領域80において合流する。流体は非混合性なので、領域80の間では互いに並流し、次に、対応する溝76, 78にそれぞれ入って行く。流体が接触領域80内にある間、非混合性流体はそれら自身で混ざり合うことないけれど、一方の流体はもう一

方の流体に対して有利な分配係数を持っており、一方の流体の分子は流体間で拡散する。

【 0 0 3 3 】

図4は、溝70、72、76、78のネットワークを持つ装置を示し、溝は合流して複合的な接触領域80を形成し、流体の接触時間を増大させる。増大した接触時間は粒子拡散を増大させる。領域85は、単一基板上の全経路長を増すために、反回転（180度回転）させる流体経路である。

【 0 0 3 4 】

上記装置の溝は、内部と外面の面積比が3：1よりも大きな値を持つ。「内部表面面積」という用語は、ここで使用されるときは、溝内部の全表面積のことをいい、ピラー（枕）やマイクロコラム（微小柱）のような内部構造物の表面積を含んでいる。その最も簡単な実施形態では、本発明の装置は単一溝を備え、「内部表面積」は2つの側壁の表面積と底部の表面積の合計である。この実施形態では、溝の深さは、最小限の表面積比を確保するために、幅と少なくとも同じ大きさである。

【 0 0 3 5 】

「外面表面積」という用語は、ここで使用されるときは、外面上の面積であって、内部構造を作るために取り除かれる基板表面の面積のことをいう。単一溝の例では、「外面表面積」は溝の上面の表面積である。ここで使用されるときは、外面表面積に対する内部表面積の比に適用されている「実質的に大きな」という用語は、約3：1よりも大きく、好ましくは約5：1よりも大きく、より好ましくは約10：1よりも大きく、最も好ましくは約20：1よりも大きいことを意味している。溝の典型的な寸法は、深さが10 μ mから1,000 μ mであり、幅が5 μ mから50 μ mである。溝を形成するのに多くの様々な方法が使用され得るが、1つの好ましい方法は、シリコン基板の深部反応イオンエッチングである。

【 0 0 3 6 】

2つ以上の分離された溝が（各溝は一非混合性の流体を通す）交差して単一の溝に合流するように配置されている。この合流距離の最大値は多くの要因に左右

され、上記要因には、各流体の極性、溝の内部表面の疎水性／親水性、流体の非混合性の度合や表面張力、2つの並流する薄い流体シースの流体安定性、相対的な流速や粘度がある。比較的安定した流体シースを仮定すると、低レイノルズ数のために乱流混合は除外される。この距離の後、好ましくは、合流した溝は2つ以上の溝に分けられ、再び2つ以上の非混合性流体流に分離される。

【 0 0 3 7 】

2つの独立した流れが合流し界面で接触する時間中、そしてその距離間において、界面におけるプロテインおよびその他の疎水性の溶液は、界面を横切って非極性流体の流れの中に拡散する。2つの流れがはじめて接触したとき、プロテインは極性流体の中を隈なく均一に分配される。しかしながら、流体が共通溝を移動するとき、2つの流体流の界面における極性流体中のプロテイン濃度は、プロテインが界面を横切って非極性流体に移動するにつれて減少し始める。そして、極性流体の界面において減少帯を形成し、極性流体流の幅を横切って濃度勾配を形成する。減少帯が補充される速度は、形成される濃度勾配および溶質拡散係数の関数になっていて、プロテインが異なる毎に変化する。典型的には極性流の幅が非常に小さいので、減少帯の補充速度は非常に速い。したがって、流体が接触領域を移動するときに、より多くのプロテインが非極性流に吸収される。流体流が共通溝に存在した後、極性流に残留するプロテインは、平衡化して再び均一な分布になる。しかしながら、プロテインの全体の濃度は減少する。

【 0 0 3 8 】

多くのこのような拡散領域が一連となって配置されると、高レベルのプロテインは、極性流から除去され、非極性流によって吸収され、非極性流に溶け込む。非常に多くの拡散領域が、シリコンチップのような超微細に製作された小さな要素に組み込まれる。ここに示された典型的な外形構造は、 1 m m^2 当たり少なくとも50個の拡散領域が可能である。

【 0 0 3 9 】

この概念に関して多くの変形が可能である。例えば、互いに接触する流体流の安定性に依って、平衡領域のない非常に長い拡散領域を持つことが可能である。この場合、流体流は要素の表面上で「平坦」である。一方、流体流の安定性が非

常に低い場合、流体が混合したり流れが不安定になる傾向を防ぐために、（ミニチュアの監獄格子のように）接触領域に沿って非常に小さいマイクロコラムまたは「ピラー」を設けることが可能である。図5はピラー91を有する装置を示している。ピラー91は流体流の安定性を増大させるために共通溝内に配置されている。図1F～1Gは、このような装置の多くの例を示す走査型電子顕微鏡写真である。なお、装置は、更なる下流側の処理を行なうべく逆操作するために、すなわち、共通溝に流れる流体を多数の別々の流れに分離するために使用することができる。例えば、図1Eの装置は、共通溝に流れる流体を6つの別々の流れに分離するために使用され得る。

【 0 0 4 0 】

図1Hは、流構造に有用な本発明による流体力学的集束装置を示す。この装置は、入口ポートと、このポートの反対側に配置された2つの側部溝とを含んでいる。入口ポートと側部溝とは、合流して共通溝に至る。作動中、試料流体は入口ポートに加えられ、試薬すなわち集束する流体は側部溝を通過して流れる。側部溝を通過して流れる流体は、試料流体を共通溝の中央の流中に流し込ませ、したがって試料流体を集束させる。この装置は、また、試料流体の特性を決定するために、共通溝に隣接して配置された光学検知器を含んでいる。

【 0 0 4 1 】

上記装置の溝の表面を変更できることによって、大きな順応性が得られて、流体流の安定性を増大させたり、物理的な混合を防止したりできる。例えば、非極性流体を通す領域内の溝表面が疎水性であるならば、流速および粘性における小さな累積的な相違の結果として、極性流体が非極性流体に不用意に流れる傾向は、著しく減少する。

【 0 0 4 2 】

液相分離のための装置に加えて、本発明は、試料流体内の所望の物質を他の物質から分離するための方法と装置とを提供する。この所望の物質は、例えば、核酸、標的細胞、有機体、プロテイン、炭水化物、ウィルス粒子、バクテリア、化学製品あるいは生化学製品であってもよい。

【 0 0 4 3 】

本発明の装置の典型的な使用例としては、試料流体から核酸の抽出と精製と濃縮がある。「核酸」という用語は、ここで使用されるときは、DNAやRNAあるいはPNAのような人工的あるいは自然に生じる核酸であって、あらゆる可能な形態、すなわち、二重ストランド核酸や単一ストランド核酸の形態やそれらの組合せたものの形態での核酸を指す。「試料流体」という用語は、ここで使用されるときは、ガスと液体とを含み、好ましくは液体をいう。試料流体は、粒子、細胞、微生物、イオン、例えばプロテインや核酸等の大小の分子を含む水性溶液である。特別の用途では、流体試料は、例えば、血液または尿の身体の流体あるいは微粉碎食品のような浮遊物であってもよい。流体試料は、例えば薬品との混合や遠心分離あるいはペレット処理など事前処理されてもよいし、未加工の状態であってもよい。

【 0 0 4 4 】

本発明の好ましい実施形態は、図6～12に示される。図6は、流体試料から例えば核酸などの所望の物質を抽出し、その物質の高濃度の溶離液を供する微小流体装置20の概略断面図である。この装置20は、入口ポート28と出口ポート30と抽出チャンバ26とを形成する本体をその中に含み、上記抽出チャンバ26は流体試料が本体を通して流れるときに流体試料から核酸を抽出する。チャンバ26は、入口ポート28と出口ポート30とを流体で連通している。これらのポートは、流体がチャンバを通して連続的に流れるように、好ましくは、チャンバ26と対向する側に配置されている。

【 0 0 4 5 】

本体は、好ましくは、ベース基板22と、このベース基板22に結合されたトップ基板24とを備える微細加工されたチップである。基板22と24とは、例えば、シリコン、ガラス、二酸化けい素、プラスチック、セラミックスなどの適当な基板材料を備えている。好ましい実施形態では、抽出チャンバ26はベース基板22に形成され、流体ポート28, 30はトップ基板24に形成されている。しかしながら、代替の実施形態では、多くの異なる形が可能である。例えば、チャンバ26はトップ基板24の中に部分的あるいは完全に形成されてもよいし、流体ポートはベース基板22の底部または側部に形成されてよい。幾つかの

これら代替の実施形態が以下に説明する。抽出チャンバ26は、流体試料がチャンバを通して流れるときに核酸を捕らえるため、十分に大きな表面積と、核酸に対して結合親和力を有する内部吸着表面とを有する。好ましい実施形態では、内部吸着表面は、チャンバ26の壁に一体に形成されてチャンバ内に伸びる内部微小構造体の配列によって、好ましくは高アスペクト比のコラム32によって、形成される。図を簡単にするために、25本のコラムのみが、図6の概略図に示されている。しかしながら、本発明の装置はより多くのコラムを含んでいると理解されねばならない。一般には、少なくとも100本のコラムを用いて装置を作ることが好ましく、さらに、1,000から10,000本のコラムを用いて装置を作ることが好ましい。コラムの数は、とりわけ、試料中の核酸の量と濃度、チャンバの寸法、コラムの間隔、チャンバを通る流体の流速などに左右される。装置を製造する特定の技術は以下に説明する。

【0046】

図8は、抽出チャンバの底部壁23から伸びるコラムの列の一部を示す。コラム32は、好ましくは、少なくとも2:1のアスペクト比（高さ、幅または直径との比）を持ち、より好ましくは、少なくとも4:1のアスペクト比を持つ。この高アスペクト比のコラム32は、核酸を捕獲するために大きな表面積を提供する。流体試料がチャンバを通して流れるとき、核酸はコラム32の表面と接触してその表面に付着する。核酸を抽出するために、抽出溶液はチャンバ内を強制的に流され、核酸をコラム32の表面から抽出溶液の中に放出する。好ましい実施形態では、コラム32は、好ましくは少なくとも100 μ mの抽出チャンバの深さと等しい高さを持つ。代替の実施形態では、抽出チャンバの深さは浅いが、100 μ m未満の深さでは、チャンバを通る流体の流れが過度に遅くなる。

【0047】

図9は、チャンバ26の中に配置されたコラム32の配列の概略図である。流体は入口ポート28を通してチャンバ26に入り、コラム32の間を流れて出口ポート30に至る。コラム32は、好ましくは、流体がチャンバ26を通して流れるときの流体とコラム表面との相互作用が最適化される配列に配置される。コラム配列の最適化は、抽出の有効性を失うことなく、チャンバを通る流体の流速

がより速くなる。

【 0 0 4 8 】

好ましい実施形態では、コラム 3 2 は幾つも列を成して配置され、一列に並んだ各々はその列に隣接するコラムから一定の間隔を開けて配置される。すなわち、一列に並んだコラムは、好ましくは、均一な中心間隔を持つ。例えば、図 9 は、水平方向に 1 0 列になった均一間隔のコラム 3 2 を示す。加えて、隣接する列は、好ましくは、各列のコラムが隣接する列のコラムと一直線上に並ばないように、互いにオフセットされている（ずらされている）。例えば、図 9 におけるコラムの各列は、隣接する列から水平方向にオフセットされている。

【 0 0 4 9 】

好ましい実施形態では、各列のコラムが少なくとも 2 つの前および／または次の列におけるコラムと一直線上に並ばないように、列はオフセットされている。このコラムの非直線性配列は続く列の形態においても行なわれ、チャンバは一つのパターンあるいは反復パターンを含んでいる。パターンは、例えば、3 ～ 1 0 列毎に繰返されてもよい。コラムの非直線性配列は、列から列に無作為であつてもよい。一般的に、上記配列における 2 つの隣接する列は、互いに、第 1 の列のコラムが第 2 の列のコラム間の丁度中間点で並ぶようにオフセットされるべきでない。それよりむしろ、目下のところ、コラム間における中心と中心の間隔の 5 0 % 以上または以下の距離だけ、隣接するコラムをオフセットさせるのが好ましい。この配置は、チャンバを通して非対称的に分裂する流れパターンを考えたものであり、流体流の支流が出来る限りコラムの表面と強力に相互作用するのを確実にする。

【 0 0 5 0 】

図 9 を参照すると、コラムの適切な配置の特定例が与えられている。各列では、隣接するコラム間の中心と中心の間隔は $15 \mu\text{m}$ である。コラムは、5 列毎に繰返されるパターンで配置されている。特に、上部の 5 列は、各々、前あるいは次の列から $6 \mu\text{m}$ オフセットされている。下部の 5 列（6 番目から 1 0 番目の列）は上部の 5 つのパターンが繰返えされ、第 6 番目の列と一番上の列が一直線上に並ぶように配置されている。例えば、コラム 3 2 A はコラム 3 2 B と一直線

上にある。勿論、これがコラムの適切な配列の一例であり、本発明の範囲を限定する意図はない。この説明から、好ましくは上述の一般的なガイドライン内で、コラムが他の多くのパターンで配置され得ることは当業者には明らかである。

【 0 0 5 1 】

図10は、列中の2つの隣接するコラムの平面図である。コラム32は、好ましくは、コラムの表面と流体の接触を最大にする断面形状と大きさを持ち、同時に流体がチャンバを通して滑らかに流れるように配慮されている。好ましい実施形態においては、このコラムは、例えば図10に示すように、六画形の流線形状をした細長い断面を持つコラムを作ることによって達成される。特に、コラム32は、それぞれ、断面長さLと断面幅Wの比が、好ましくは少なくとも2:1、より好ましくは少なくとも4:1である。さらに、断面の長さLは、好ましくは2から200 μ mの範囲の中にあり、断面の幅Wは、好ましくは0.2から20 μ mの範囲の中にある。

【 0 0 5 2 】

一列に並んだ隣接するコラム間の間隙距離Sは、好ましくは、流体が過度の抵抗を持つことなくコラム間を流れることができるように、出来るだけ小さい値が選定される。一般的には、間隙距離Sは0.2から200 μ mの範囲であるが、より好ましくは、2から20 μ mの範囲である。2から20 μ mの範囲は、チャンバを通る流体流に過度の抵抗を引き起こすことなく、流体がコラムの表面と実質的に接触するので、現在最も好まれている。隣接するコラム間の中心と中心の間隔は、断面幅Wと間隙距離Sの合計であり、好ましくは、0.2から40 μ mの範囲内にある。

【 0 0 5 3 】

図9における縦の寸法である抽出チャンバ26の長さは、好ましくは、100から5,000 μ mの範囲の中にあり、より好ましくは、少なくとも1,000 μ mである。抽出チャンバ26の幅は、好ましくは、100から3,000 μ mの範囲内である。流体ポート28と30とは、各々、好ましくは、少なくとも100 μ mの幅または直径を持つ。現在のところ、チャンバ26は、コラム32の配列と流体ポート28,30とに対して十分な余裕を持つために、最小1,000 μ

mの長さを持つことが好ましい。特に、チャンバ26の端部に流体ポート28、30が加わる開放空域を残し、コラム23の配列をチャンバ26の中央領域に制限するのが目下のところ好ましい。この配置は、流体がコラム32の間に流れる以前において、チャンバ26に流れ込む流体の均一性を増大させる。

【 0 0 5 4 】

再び、図6を参照すると、例えばコラム32やチャンバ壁のようなチャンバ26の内表面は、核酸と結合親和力の強い材料で被覆される。適当な材料としては、例えば、シリコンや二酸化けい素のようなシリコン誘導体、ポリマーやポリアミドのようなポリマー誘導体、核酸、或る種の金属、ポリペプチド、プロテイン、多糖類が含まれる。

【 0 0 5 5 】

ガラスの珪酸塩 (SiO_2) の特性は、核酸を攻撃して固化することができる。シリコンが酸化されると、表面は同じような化学的な性質になる。このような表面に対する非永続的な（非共有結合の）付着（吸着）は、典型的には、その表面と捕獲される成分との間の弱い双極分子や水素結合あるいはイオン相互作用に基づいている。これらの相互作用は、溶媒および／または表面のイオン特性における変化、熱、或いはその他の生理化学的な手段を介して、可逆的である。多くの物質が、溶液中の溶媒と溶質との様々な相互作用を有するように、調整され得る。ポリマーは、特定の相互作用を与える活性表面郡を持つことができ、また、イオンまたは水素結合能力を与える共重合体またはドーパントを持つことができる。あるポリマーは、可逆的な極性あるいは調整可能な伝導性を持つことができる。人工または自然界のポリペプチドとプロテインは、同じように、溶質分子と様々な相互作用を持つ能力を示す。金のような金属は、DNAを捕獲する能力を持つことが良く知られており、その電子特性の故に、溶質との相互作用を変化できる。チャンバ26の内表面は、例えばウィルスからの特定配列のRNAやバクテリアからの特定配列のDNAなど、特に目標となる核酸と強い結合親和力のある材料で被覆されてもよい。これは、目標の核酸配列に対して相補する特定の核酸配列で内表面を被覆することによって、成し遂げられる。これらの表面は装置製造中あるいは使用直前に被覆される。

【 0 0 5 6 】

微小流体装置 20 は、好ましくは、抽出チャンバ 26 を加熱するヒーターを含んでいる。このヒーターは、チャンバから核酸を非常に効率的に放出するように配慮されていて、大量の核酸が小さな容積の溶離流体に放出される。ヒーターは核酸の捕獲を促進するために使用される。小さな容積のマイクロチャンバでヒーターを使用することの 1 つの利点は、最小限のエネルギーが装置を加熱するのに必要とされることである。

【 0 0 5 7 】

一般に、ヒーターはチャンバ 26 を加熱するために適当な機構を備え、この加熱機構には、抵抗型ヒーターあるいは可視光線や赤外線を伝える光学ヒーターあるいは電磁気ヒーターが含まれる。もし、装置 20 の本体が電氣的に伝導性のある物質から、好ましくはシリコンから製造されるならば、ヒーターは、チャンバ 26 を形成する本体の一部に電圧を加えるために、電源と電極とを簡単に備えることができる。また、熱伝導性の高い物質は、加熱時間を短くし、要求される電力を減少させ、温度を均一にする。この実施形態は、以下により詳細に記載される。

【 0 0 5 8 】

好ましい実施形態では、ヒーターは、チャンバ 26 の底部壁に結合した抵抗型加熱要素 34 を備えている。図 8 に示すように、抵抗型加熱要素 34 は、好ましくは、基板 22 の底部表面にパターン化される金属または炭素またはポリシリコンの薄膜である。この代替えとして、加熱要素は積層にされた加熱源を備えてもよい。上記積層にされた加熱源は、例えば、基板 22 に取付けられエッチングされた箔膜加熱要素である。電気伝導性を有する結合パッド 38 A, 38 B は、基板 22 上でパターン化されて、加熱要素 34 の対向端部に電氣的に接触する。

【 0 0 5 9 】

結合パッド 38 A, 38 B とは、加熱要素 34 に電圧を印加するために電気リード線によって電源に接続される。好ましくは、例えばコンピューターまたはマイクロプロセッサまたはマイクロコントローラのような適当にプログラムされたコントローラによって、電源の制御が行なわれる。上記コントローラは、幾つ

かの予め決められた時間／温度グラフを用いて、加熱要素34に供給される電力量を変化させることによって、チャンバ26を制御するようにプログラムされている。

【 0 0 6 0 】

微小流体装置は、好ましくは、抽出チャンバ26の温度を測定するために、コントローラとつながる1個以上の温度センサーを含む。一般的に、温度センサーは、サーモカップル、抵抗型温度計、サーミスター、IC温度センサー、クォーツ温度計など、温度を測定するための適切な装置である。これに代わって、加熱要素34の抵抗温度係数は、温度を示す抵抗値を測定することによって、チャンバ温度を監視し、熱の投入量を制御する手段として使用される。

【 0 0 6 1 】

好ましい実施形態では、温度センサーは電気伝導性材料のストリップ（細長片）36を備え、ストリップ36は基板22上にパターン化されている。ストリップ36は、材料の温度に依って変化する電気抵抗を持つ材料から成っていて、ストリップ36の抵抗を監視することによって、チャンバ26の温度が監視される。また、電気伝導性のある結合パッド40A、40Bが、基板22上にパターン化されて、センサーストリップ36の対向端部に電氣的に接触する。

【 0 0 6 2 】

代替の実施形態では、基板22は、基板にパターン化された付加的な結合パッド42を持ち、基板22にバルク接触を提供している。このバルク接触は、核酸を誘引および／または溶離する電圧で、チャンバの内部吸着表面を帯電するのに使用される。抵抗型加熱要素とセンサーストリップと結合パッドを形成する適当な金属には、アルミニウムと金と銀と銅とタングステンとが含まれる。

【 0 0 6 3 】

結合パッド40A、40Bは、電気導線によってコントローラに接続される。コントローラは、好ましくは、センサーストリップ36の抵抗値に依って、加熱要素34に供給される電力量を調整するようにプログラムされる。こうして、コントローラと電源と加熱要素と温度センサーとは、チャンバ26の温度を制御するための閉回路温度制御システムを形成する。閉回路システムが目下のところ好

まれるが、代替の実施形態では、温度センサーを除去してもよく、また、装置は開回路形式で作動してもよい。さらに、例えば、1つ以上のマイクロプロセッサとマルチプレキサ（多重チャンネル）と電力制御回路構成要素とセンサー回路構成要素とを有するプロセッシングエレクトロニクスが、装置に含まれてもよく、或いは装置本体外に配置されて装置本体と接続されてもよい。

【 0 0 6 4 】

本発明の微小流体装置は、好ましくは、流体試料の処理と分析のためのカートリッジまたはこれと同類の装置と組合せて使用される。微小流体装置が使用される適当なカートリッジは、1997年12月24日に出願された米国特許出願第08/998,188号に開示されている。この開示内容は、言及によってここに組み込まれる。

【 0 0 6 5 】

図12は、カートリッジ101の例を示し、このカートリッジとともに本発明の微小流体装置が使用されている。この例では、カートリッジ101は、生物学上の液体試料を処理し、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって核酸を拡大するように設計されている。カートリッジ101は、流体試料をカートリッジに導びく試料ポート103と、溶解試薬を貯蔵する貯蔵サイト109と、洗浄試薬を貯蔵する貯蔵サイト125とを含んでいる。また、カートリッジは、流体試料を溶解するための溶解サイト107と、流体試料がフィルタと接触して試料から有機堆積物や細胞を取り除くフィルタサイト119と、溶離流体を貯蔵するための貯蔵サイト127とを含んでいる。

【 0 0 6 6 】

カートリッジは、好ましくは、微小流体装置20を収容する窪みまたは凹部またはへこみと共に製造される。装置20はカートリッジ101に挿入されて、装置の入口ポートが溶解サイト107やフィルタサイト119といった1つ以上の前処理サイトと流体で繋がる。装置20の出口ポートは、廃棄サイト139およびPCR試薬の入った試薬サイト141と流体で繋がる。試薬サイト141は、PCRの増幅と検出のためのPCR反応サイト143と流体で繋がっている。

【 0 0 6 7 】

カートリッジ101は、好ましくは、カートリッジを通る流体の流れを制御するために、流体ダイオードまたは流体バルブのような流れコントローラ123を含んでいる。カートリッジ101は、また、好ましくは、様々な溝とサイトにおける流体の存在を検知する抵抗型センサー115を含んでいる。また、カートリッジ101は、流体をカートリッジに強制的に流す外部流体動力源を含むか或いは連結されている。一般的に、流体動力源は、流体をカートリッジに強制的に流す適当な機構を備える。その機構にはポンプや空気圧源や吸引装置が含まれている。図12の実施形態では、流体動力源は、サイト103、109、125、127に配置された複数の電解ポンプあるいは流体充満ポートを備え、流体充満ポートは空気圧や機械的圧力や油圧によって空にされる。

【0068】

また、カートリッジ101は、例えば、1以上のマイクロプロセッサとマルチプレキサと電力制御回路とセンサー回路などのプロセッシングエレクトロニクス151を含んでいて、カートリッジおよび微小流体装置20の作動を制御する。プロセッシングエレクトロニクス151は、電気リード線147によってカートリッジ内の様々なサイトと貯蔵領域とポンプとセンサと溝とに接続されている。特に、リード線147はプロセッシングエレクトロニクス151を微小流体装置20の結合パッドに接続して、装置内の抽出チャンバの温度が正確に制御される。

【0069】

図12では、プロセッシングエレクトロニクス151はカートリッジ101の上に物理的に配置されているが、プロセッシングエレクトロニクスは、カートリッジの外部、例えば、カートリッジ101が挿入される大きなプロセッシング器械の中に配置され得ることを理解されねばならない。この実施形態では、カートリッジ101は、好ましくは、薄いカード状の部分を含んでいて、カートリッジを器械内の嵌合コネクタに電氣的に接続する。嵌合コネクタは、プリント回路基板に使用される標準エッジコネクタと同様じようなものである。この代わりに、カートリッジのインストルメント（器械）へのデータリンクは他のものでもよく、例えば無線周波数リンクや赤外線リンクのようなものであってよい。

【 0 0 7 0 】

作動中に、核酸を含む流体試料は、カートリッジの試料ポート 1 0 3 に加えられ、（例えば、電解ポンプまたは機械的なポンプを用いて）強制的かつ連続的に溝 1 0 5 に流されて、溶解サイト 1 0 7 に至る。同時に、溶解試薬が貯蔵サイト 1 0 9 から放出され、強制的かつ連続的に溝 1 1 1 に流されて、溶解サイト 1 0 7 に至る。適切な溶解試薬には、例えば、グアニジン塩化水素、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジンイソチオシアン酸塩、ヨウ化ナトリウム、尿素、過塩素酸ナトリウム、臭化カリウムといった攪乱塩入りの溶液が含まれている。

【 0 0 7 1 】

溝 1 0 5 と 1 1 1 の中をそれぞれ移動する流体試料および溶解試薬は、抵抗型センサー 1 1 5 によって検出される。溶解試薬が、溶解サイト 1 0 7 を流れる流体試料と接触するとき、流体試料中に存在する細胞は溶解する。流体試料と溶解試薬とは続いてフィルタサイト 1 1 9 に流入し、フィルタサイト 1 1 9 において、試料がフィルタと接触して小片は流体試料から除去される。流体試料と溶解試薬とは、フィルタサイト 1 1 9 から溝 1 2 1 に行き、強制的かつ連続的に微小流体装置 2 0 に流される。

【 0 0 7 2 】

図 9 を再び参照すると、流体試料と溶解試薬が抽出チャンバ 2 6 を貫流するとき、流体試料中の核酸はチャンバ壁とコラム 3 2 の表面に付着し、一方過剰な物質は出口ポート 3 0 を通ってチャンバ 2 6 から流出する。チャンバ 2 6 を通る流体試料の流速は、好ましくは、 $0.1 \sim 50 \mu\text{L} / \text{sec}$ の範囲である。図 1 2 を再び参照すると、装置 2 0 内に存在する流体試料と溶解試薬とは、溝 1 3 5 を流れて、流れコントローラ 4 1 A を通り、溝 1 3 6 を通って廃棄サイト 1 3 9 に至る。他の実施形態では、流体試料は、チャンバを貫流した後、再度方向付けられて追加の回数だけチャンバを再循環する。

【 0 0 7 3 】

流体試料が装置 2 0 に強制的に流された後、貯蔵サイト 1 2 5 中の洗浄試薬は溝 1 2 9 に流されて、装置 2 0 に流れ込む。好ましい洗浄流速は、約 $0.5 \sim 50 \mu\text{L} / \text{sec}$ である。溝 1 2 1、1 2 9、1 3 1 内の流れコントローラ 1 2 3

は、流体がカートリッジ内で上流側に流れるのを防止する。洗浄試薬は、装置20の内部吸着表面上から、攪乱塩のような残留汚染物質を洗い落す。変化するpHと溶媒成分とイオン力の種々適切な洗浄溶液が、この目的に使用されており、それらの洗浄溶液は当該技術では周知となっている。例えば、適切な洗浄試薬の一つは、80 mM酢酸カリウムと8.3 mM三重塩化水素とpH 7.5の40 μ Mエチレンジアミン四酢酸と55%エタノールとの溶液である。洗浄試薬は、続いて、流れコントローラ41Aを通過して廃棄サイト139に流れ込む。

【 0 0 7 4 】

上記装置20を洗浄した後、貯蔵サイト127からの溶離流体は、強制的に溝131に流れされ、上記装置20に通される。そして、核酸は抽出チャンバの内部表面から溶離流体の中に放出される。この時点で、流れコントローラ41A、41Bは変更されて、溶離流体が流れコントローラ41Aを通過して流れるのを防止し、溶離流体が流れコントローラ41Bを通過して試薬サイト141内に流れ込む。装置20を通る溶離流体の流速は、好ましくは、0.1 ~ 1 μ /secの範囲内にある。溶離流体の流速は流体試料の速度と比較して比較的遅く、より多くの核酸がチャンバから放出されるよう考慮されている。

【 0 0 7 5 】

一般的に、適当な溶離流体が装置20から核酸を溶離するのに使用される。このような溶離流体は当該技術においては周知である。例えば、溶離流体は分子グレードの純水あるいは緩衝溶液をからなる。緩衝溶液は、限定されるものではないが、TRIS/EDTAとか、例えば4 mMトリスアセテート (pH 7.8) と0.1 mM EDTAと50 mM塩化ナトリウムとのTRIS/アセテート/EDTAとか、TRIS/ホウ酸塩とか、TRIS/ホウ酸塩/EDTAとか、リン酸カリウム/DMSO/グリセロールとか、NaCl/TRIS/EDTAとか、NaCl/TRIS/EDTA/TWEENとか、TRIS/NaCl/TWEENとか、リン酸塩緩衝剤とか、TRIS緩衝剤とか、HEPES緩衝剤とか、核酸拡大緩衝剤とか、核酸交雑緩衝剤とかの溶液を含む。

【 0 0 7 6 】

溶離流体を装置20に強制的に流す前に、中間的な空気間隙段階が随意に行な

われる。ガスは、好ましくは空気は、強制的に装置20に通って流される。これは、洗浄溶液を装置に流した後に、且つ溶離流体が装置に流す前に行なわれる。空気間隙段階は、液相を明確に分離するものであり、また、溶離前に残留する洗浄溶液のチャンバを少なくとも実質的に乾燥させるのに役立つ。

【 0 0 7 7 】

装置20の抽出チャンバは、好ましくは、溶離流体が装置に強制的に流されるときに加熱されて、溶離効率を増大させる。以前に記載したように、この加熱は、好ましくは、プロセッシングエレクトロニクス151の制御下で、閉回路フィードバックシステムにおいて装置20の抵抗型加熱要素に電力を供給することによって行われる。

【 0 0 7 8 】

好ましい実施形態では、チャンバの内部表面は、溶離流体がチャンバ1に流れるときに、60度Cから95度Cの範囲の温度に加熱される。

【 0 0 7 9 】

核酸を含む溶離流体は、装置20を出て溝135に移動し、試薬サイト141に至る。溶離流体と核酸は、サイト141に入れられた乾燥PCR試薬と接触し、再構成される。そして、溶離流体と核酸とPCR試薬は、続いて、PCRの拡大と検出のために反応サイト143に流入する。代替の実施形態では、溶離流体は既にPCR試薬を含んでいるので、サイト141で試薬を乾燥させる必要はない。通気孔145は、廃棄サイト139と繋がっていて、反応サイト143は処理中にガスの放出ができる。

【 0 0 8 0 】

好ましい実施形態の貫流装置の利点は、例えば数ミリリットル以上の比較的大きな容積の流体試料からの核酸を、例えば25 μ L以下のはるかに小さな容積の溶離流体中に濃縮させることができる。従来の微小流体装置は流体試料の容積をマイクロリットルの丸い塊りに限定するが、この従来の微小流体装置とは対照的に、本発明の装置は、ミリリットルの量の流体試料から核酸を効率的に抽出し、核酸を溶離してマイクロリットルの量の溶離液にすることによって並はずれた濃縮率を可能にしている。

【 0 0 8 1 】

特に、装置を強制的に流された流体試料の容積と抽出チャンバの最大収容容積との比は、好ましくは少なくとも2 : 1であり、より好ましくは少なくとも10 : 1である。好ましい実施形態では、抽出チャンバは、0.1から25 μ Lの範囲の最大収容容積を持つ。装置を強制的に流れる流体試料の容積は、0.5から500 mLの範囲にあつて、100以上の濃縮率を可能にする。例えば、この装置では、1 mLの流体試料から核酸が捕獲されて、10 μ L以下の溶離流体中に濃縮される。これらのパラメータは、好ましい実施形態の具体例であつて、本発明の範囲を限定しようとするものではない。代替の実施形態では、抽出チャンバの最大収容容積および処理される流体試料の容積は、特定の用途に装置を調整するために変化され得る。

【 0 0 8 2 】

好ましい実施形態の微小流体装置のもう1つの利点は、チャンバの内部吸着表面の急速直接加熱が考慮されていることである。チャンバ壁およびコラム構造の一体性と高い熱伝導性は、チャンバ内の流体の加熱を要することなく、加熱要素から吸着表面へ直接的かつ急速な熱移動を引き起こす。この効率の改善は、加熱に要する電力の減少のみならず、加熱速度および加熱精度あるいは正確さという点で重要である。特に、核酸が結合する内部表面の急速かつ直接的な加熱は、核酸の溶離度と溶離効率を著しく増大させ、従来技術の方法や装置に重要な改善をもたらす。

【 0 0 8 3 】

好ましい実施形態の微小流体装置の利点は、微小流体装置が、一体に形成された微小構造の配列を含んで、好ましくは高アスペクト比のコラムを含んで、流体試料から核酸を分離する際に、高い効率と制御とを提供していることである。吸着表面の直接かつ急速な加熱に加えて、この微小構造は、核酸を補足し溶離させるチャンバ有効表面積を著しく増大させる。さらに、この微小構造体の形状と配置は、ビードやフィルタや膜に比較して、流体処理中に流体試料または核酸が装置の中に補足される可能性を増大させる。

【 0 0 8 4 】

さらに、規則的に間隔の開いたコラムを用いて、コラム間の拡散距離は一定であって、均一な流体流が存在する。したがって、核酸は、不揃いな特性をもつビードや繊維とは対照的に、同一「微小環境」に晒される。この均一性が、各処理段階に必要な時間、流速、加熱量、流体容積などを含む抽出パラメータの予知を可能にしている。さらに、内部構造の配列を用いることによって得られる効率の増大、および、吸着面の急速かつ直接的な加熱によって得られる効率の増大は、チャンバを通る流体の比較的高い流速で、効率的な核酸の抽出と溶離を可能にしている。これは、抽出と溶離に要する全時間を減少させる。

【 0 0 8 5 】

さらには、装置20を少し変化させたものは、溶液またはエマルジョンから核酸を選択的に抽出するのに使用され得る。下に伝導体を持つシリコンーガラスをベースにした薄厚絶縁体は、本質的に、分離装置として役立つ。絶縁体の厚みは $1 \sim 1,000 \mu m$ である。直流電圧(0.1 ~ 100 V)が伝導体に印加される。流体試料内の核酸はガラス表面に選択的に誘引され、続いて核酸がガラス表面から容離される。

【 0 0 8 6 】

一実施形態では、装置は抽出チャンバを含み、抽出チャンバは単一の基板から作られた垂直コラムを有しており、垂直コラムは電氣的にも物理的にも均一のものである。コラムは二酸化けい素の薄層で被覆されている。基板は、その上にパターン化された結合パッドを有して、基板にオーミック接触を与える。オーミック接触は第1の電極として機能し、装置はさらに第2の電極を、好ましくはチャンバに配置されたワイヤを含んで、流体試料と電氣的な接触を行なう。電極は、核酸を誘引および/または溶離する電圧で、流体試料に対してチャンバの内部吸着面を帯電させるために使用される。

【 0 0 8 7 】

試料が装置を貫いて流れるときに、電圧が電極間に印加され、制御された密度の表面電荷が形成されてチャンバの内部表面を均一に覆う。緩衝溶液および担体溶液の成分は、標的巨大分子の正味電荷と同様に、コラム表面の電荷分布を制御するために変更され得る。例えば、微小構造体の表面における電荷の深さと密度

は、流体の pH とイオン力によって著しく影響を受ける。例えば、標的と共に溶けている両性電解質と両性イオンと大量の巨大分子を使用することによって、あるいは、二重電気泳動におけるように、複数の印加される電圧をパルスさせることによって目標成分の吸着は増大する。後者の方法は、試料または洗浄溶液が流れている間に、より強力に結合した標的成分から弱い結合の非標的混合物を分離するために使用される。

【 0 0 8 8 】

この代わって、交流電圧は、チャンバの内表面への DNA (他の分子ではない) の誘引および保持を促進する周波数に整調される。流体試料の全容積が装置を通過した後、様々な洗浄溶液が装置に導入されて、緩く結合した不要物質を除去する。pH や塩濃度の変化、あるいは洗浄剤や攪乱剤のような添加剤の使用は、このような除去を増大させるのに使用される。溶離のために、少量の担体溶液がこの装置に導入される。電圧の極性は、(核酸を保持する) 正から負に転換される。そして、核酸は、内部表面から放出され、非常に濃縮された丸塊となって装置から流出する。内部表面から核酸を移動させる交流周波数が選択された二重電気泳動を使用することによって、放出の効率は増大する。

【 0 0 8 9 】

生物分析物の構造物への吸着または生物分析物の構造物からの放出は、装置に超音波エネルギー伝達手段を付与することによって増大される。構造物は振動するように誘導されて、抽出工程では個々の分子とコラムとの間の接触頻度が増大し、放出段階すなわち溶離段階では分子が構造物から剥ぎ取られる。加えて、圧電性セラミックディスクが装置の外表面に結合される。このディスクに交流電圧を印加することによって、撓みが起こり、微小構造物の配列が曲がる。共振時に、構造物の動きは最大になる。小型の超音波ホーンを装置に組み込ませても、この目的を達成することができる。

【 0 0 9 0 】

別の実施形態では、伝導性材料からなる別の一組みの反応構造物が、この装置の中に含まれる。これらの反応構造物は、電気泳動パルスを引き起こす電極として機能し、非伝導性であるが帯電した吸着表面に巨大分子が遭遇する確立を増大

させる。また、上記反応構造物は、非伝導性の構造物すなわちコラムの配列から結合標的分子の除去を促進するのにも使用される。後者は、非伝導性キャパシタンス電極の電圧極性の反転を同時に伴ってあるいは伴うことなく為され、また、化学的に介在した脱着を伴ってあるいは伴うことなく為される。

【 0 0 9 1 】

本発明の別の局面では、配位子結合方法が装置の構造体に使用される。特定の分析物捕獲表面を形成するために、核酸やプロテインのような配位子結合部分が、構造体の表面に能動的あるいは受動的に取付けられる。シランベースの化学反応のような配位子結合化学反応が使用される。二重機能のリンカ（連鎖）が使用され、内部表面に結合する一方の機能と、流体試料中の標的に結合する他方の機能とを有する。次に、試験分析物の入った試料が装置に通され、分析物が配位子で覆われた表面に結合する。続いて1以上の洗浄溶液で洗浄した後、配位子と分析物の複合体を溶離することができる。代替として、レポート分子と共役な二次的反分析物分子が装置に通され、この共役物が分析物によって補足される。この複合体も溶離される。

【 0 0 9 2 】

本発明の装置は、オレゴヌクレオチドおよびポリペプチドのようなバイオポリマーの連結合成物に対して有用である。連結合成物は、非常に多数の配列を装置の中で合成させる。これは、別個にアドレスできる反応／抽出微小構造体において、単量体を運搬、濃縮、反応させることによって、試薬と触媒を結合と非ブロック化することによって行なわれる。このように使用することによって、装置の能力を利用して、互いからそして近くの試薬から選択された微小構造体を絶縁する。

【 0 0 9 3 】

好ましい実施形態の微小流体装置20は、フォトリソグラフィおよび／または超微細機械加工を含む様々な技法を使用して製作される。製作は、好ましくは、シリコン上またはガラスや二酸化けい素やプラスチックやセラミックスのような他の適当な基板材料上で行なわれる。深部反応イオンエッチング（DRIE）を使用して微小流体装置を製作する好ましい方法が、ここに記載される。

【 0 0 9 4 】

ベース基板22のスターティング材料として、100mmのn型(100)の0.1-0.2オームcm両側面研磨シリコンウエハが使用されている。ウエハの厚みは、好ましくは、望まれる構造体に依って、350から600 μ mの範囲にある。装置を作る一実施例では、好ましくは、背面領域に0.2から5 μ mの深さまで燐イオンを注入してオーミック接続がなされる。

代わりに、p型のシリコンウエハが使用されてもよく、オーミック接触はボロニイオン注入を用いて行なわれる。注入の次は、基板を加熱してドーパントを活性化させる。

【 0 0 9 5 】

次に、ウエハは回転され、前面側に(例えば、シップレイ(Shipley)から入手可能な)フォトレジストを使用して、DRIE処理をマスクするのに十分なフォトレジスト厚を得る。この厚みはエッチングの最終所望厚みに依る。シリコンエッチング速度とフォトレジスト腐食速度との比は、典型的には50:1よりも大きい。200 μ mの構造体をエッチングするには、通常、4 μ mのフォトレジストで十分である。フォトレジストは90度Cで約30分間ソフトベークされ、次に、シリコンウエハ処理技術では周知のプロセスを使用して、所望のマスクパターンで露光され、現像され、ハードベイクされる。

【 0 0 9 6 】

図11は、ウエハの前面側の試料マスクパターンを示す。エッチマスクは、チャンバパターン44を定めて基板22内に抽出チャンバを形成し、コラムパターン46の配列を定めて基板内に対応するコラムの配列を形成する。図面サイズの空間的な限定により、エッチマスクは数百のコラム46のみで図示されている。しかしながら、配列は1,000から10,000のコラムパターンを含み、基板22内に対応する数のコラムを形成する。

【 0 0 9 7 】

次に、パターン化されたウエハは、DRIEプロセスを使用してエッチングされ、抽出チャンバと一体型コラムを形成する。エッチングするのに有用な装置は、カリフォルニア州レッドウッドのサーフェステクノロジーシステムから入手で

きる。DRIEプロセスは、誘電結合プラズマエッチングと、フッ素ベースの化学薬品を使用した析出とを交互に用いる。エッチングされた構造体における20 : 1のアスペクト比は、容易に達成される。エッチング速度は典型的には2 μm /分以上である。

【 0 0 9 8 】

エッチング後、残りのフォトレジストは、例えば酸素プラズマエッチングまたは硫酸中での湿式化学ストリッピングによって、ウエハから除去される。次に、基板は、チャンバの内部表面すなわちチャンバ壁およびコラム表面を酸化層で覆うように酸化される。酸化層は、好ましくは1から100 nmの厚みであり、例えば、熱成長または化学成長または電気化学成長あるいは析出などの周知の技術を使用して形成される。

【 0 0 9 9 】

次に、例えばアルミニウムまたは金または銅などの電氣的に伝導性のある材料が、基板の背面側に析出されパターン化されて、抵抗型加熱要素と温度センサと結合パッドを形成する。加熱要素およびセンサを形成するのに別の材料が使用されてもよい。基板上の金属をパターン化する具体的な技術は、当該技術分野においては周知になっている。次に、基板は、例えば500 μm の薄いパイレックス（登録商標）ガラスカバーに陽極結合される。このガラスカバーには、その中に例えば超音波ミリングによって孔が作られている。上記孔はチャンバへの流体ポートを形成する。結合後、基板対は、ダイヤモンドソーを用いて、さいの目状に切断される。その結果得られる構造は、図6に概略的に示される。

【 0 1 0 0 】

微小流体装置の正確な寸法と構造は、装置を特定の用途に適合させるように変更される。本発明による可能な装置の特定例としては、次のものがある。この装置は4.0 mm平方で0.9 mmの厚みがある。抽出チャンバは200 μm の深さと2.8 mmの長さおよび幅をもっている。流体ポートはそれぞれ0.4 mmの幅を持っている。装置は、チャンバ内に2.0 mm \times 2.8 mmの面積を占有する蜜なコラムの配列を持っている。コラムは、200 μm の高さと、50 μm の断面長さと、7 μm の断面幅と、列になって隣接するコラム間の8 μm の間隙距離と、

15 μm の中心間の間隔とを持つ。その配列には、約7,000のコラムが存在する。勿論、これらの寸法は、代表的な一実施例であって、本発明の範囲を限定するものではない。代替の実施形態では、装置の各材料の特定寸法は、好ましくは、本稿のはじめに記載した一般的な指針内で変化し得る。

【 0 1 0 1 】

本発明の微小流体装置との使用に適したカートリッジを製作するための特定技術は、1997年12月24日出願された米国特許出願番号第08/998,188号に開示されている。例えば、カートリッジは少なくとも1つの射出成形またはプレス成形または機械加工されたポリマー部品から作られる。ポリマー部品は、窪みまたは凹部またはへこみがその表面に作られて、幾つかの溝の壁と反応サイトと貯蔵サイトとを形成する。射出成形または機械加工に適したポリマーの例には、例えば、ポリカーボネイト、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、アクリル、および市販の高分子化合物がある。第1の部分に対して形状が補間的な第2の部分は、第1の表面に嵌合されて、カートリッジの残りの部分を形成する。第2の部分または第3の部分は、カートリッジと電気的な接触をするためのプリント基板であってもよい。これらの技術を使用して、微小流体装置をカートリッジの窪みの1つに組み込む。装置は、シリコン接着剤のような可撓性のあるポリマーを塗って、カートリッジに取付けられる。これに代わって、装置の流体ポートに孔を合わせてガスケットが作られ、密閉された流体アセンブリが微小流体装置とカートリッジ本体との間に形成される。この装置は、ガスケット材料に対して、しっかりプレスされ、装置上に別のプラスチック品を結合することによって密閉さて、装置は完全にカートリッジの中に被包される。

【 0 1 0 2 】

代替として、装置は、ガスケットを使用することなく、カートリッジに直接溶融または溶接される。特に有利な実施例では、カバーを形成するために例えばバイレックス（登録商標）ガラスの別の基板を使うのではなく、カートリッジの一部が装置のカバーになる。この実施例では、基板22がカートリッジに挿入され、カートリッジの壁に密封される。この壁は、その中に孔を持っていて、抽出チャンバへの流体ポートを形成する。

【 0 1 0 3 】

図 1 3 は、本発明の代替の実施形態を示していて、この実施形態では微小流体装置は、頂部基板 2 4 でなくベース基板 2 2 に形成された流体ポート 2 8、3 0 を持つ。装置は、チャンバ 2 6 の内部表面を加熱するための電極 4 8 A と 4 8 B を含んでいる。これらの電極は、好ましくは、抽出チャンバの底部壁 2 3 上の対向する側に配置される。ベース基板 2 2 は、熱的に伝導性のある好ましくはシリコンから製造される。したがって、底部壁 2 3 および一体に形成されたコラムは、電極 4 8 A と 4 8 B とに適当な電圧を印加することによって加熱される。好ましい実施形態では、装置は、好ましくは、流体試料のための前処理サイトおよび/または後処理サイトとを持つカートリッジとの組合わせて使用される。カートリッジは電極 4 8 A と 4 8 B に電力を供給するための適当な処理電極を含んでいる。装置の作用は、チャンバ 2 6 の内部表面が電極 4 8 A と 4 8 B とに電圧を印加することによって加熱される以外、上記の好ましい実施形態の作用に類似している。底部壁 2 3 は、チャンバ 2 6 を加熱する抵抗型加熱要素として機能する。

【 0 1 0 4 】

図 1 3 の微小流体装置は、フォトリソグラフィおよび/または超微細機械加工を含む様々なテクニックを使用して製造される。装置を製造するための好ましい方法がここに記載される。

【 0 1 0 5 】

1 0 0 m m の n 型 (1 0 0) シリコンウエハが、ベース基板 2 2 のスターティング材料として使用される。ウエハは、好ましくは、電極 4 8 A、4 8 B 間の所望の最終的な抵抗に依って、1 ないし 1 0 0 オーム c m の抵抗率を持つ。ウエハの厚みは、好ましくは、所望の構造に依って 3 5 0 から 6 0 0 μ m の範囲内にある。背面側に好ましくは 0. 2 から 5 μ m の深さまでの燐イオンの注入を用いてオーミック接続がなされる。この代わりに、p 型のシリコンウエハが使用されてもよく、また、オーミック接続はボロンイオン注入を使用して行なわれてもよい。注入の後には、ドーパントを活性化するために基板を加熱する。

【 0 1 0 6 】

次に、ウエハの背面側に、例えば窒化シリコンのような適当なマスキング材料を析出し、パターニングを行い、このマスクを使用してシリコンを異方性エッチングすることによって、流体ポート28と30が形成される。次に、ウエハは前面側にフォトリソでパターン化されて、DRIE処理のためのエッチマスクを得る。図13に示すように、エッチマスクは、基板22に抽出チャンバを形成するためのチャンバパターン44を定め、基板にコラムの配列を形成するためのコラムパターン46の配列を定める。パターン化されたウエハは、DRIE処理を使用してエッチングされて、抽出チャンバと一体型コラムを形成する。ウエハは十分な深さにまでエッチングされて、抽出チャンバ26が流体ポート28と30とに出合う。

【 0 1 0 7 】

エッチング後、残留するフォトリソはウエハから除去され、次に基板は酸化されて、チャンバ26の内部表面は好ましくは1 μ mから100 μ mの厚みの酸化層で被覆される。次に、例えばアルミニウムや金や銅のような電氣的に伝導性のある材料が、基板の背面側の注入領域上に析出され、パターン化されて、電極48Aと48Bとが形成される。次に、基板22はカバー24に、好ましくは薄いパイレックス（登録商標）ガラスに、陽極結合される。結合の後、基板対はさいの目に切断されて、図13に示す最終構造を形成する。

【 0 1 0 8 】

図14は本発明の別の実施形態による貫流装置21を示し、この流装置21においては、核酸を捕獲し溶離するための内部吸着面が、チャンバ26内に收容された1つ以上の固形支持物によって形成される。流体試料がチャンバ26を流れるとき、核酸は固形支持体に接触し付着する。核酸を溶離するために、溶離流体がチャンバ内に流される間、チャンバ26は加熱され、したがって、核酸が固形支持体から溶離流体に放出される。核酸を捕獲するための適当な固形支持体は、例えばシリカやジエチルアミノエーテル（DEAE）およびポリマーのような核酸と結合親和性のある物質を備えたビーズ、ファイバ、膜、グラスウール、フィルタペーパー、ゲル等を含む。

【 0 1 0 9 】

図14の実施の形態においては、固形支持体はチャンバ26の中に詰められたガラスビード50である。固形支持体としてビーズ、ファイバ、ウールまたはゲルを使用する実施例では、好ましくは、装置は出口ポート30に隣接したチャンバ26の中に配置された障壁52を含んでいて、固形支持体がチャンバから流出するのを防止する。障壁52は、固形支持材料をチャンバ26内に保持するために、何か適当な保持膜やフィルタ、例えば櫛型フィルタであってもよい。この代わりに、障壁52は、十分な小さい間隔を有して固形支持物質を保持するコラムのような複数の内部構造物をチャンバの中に備えてもよい。図1Dは、フィルタを形成する一列のコラムを示し、コラムはチャンバの中にビーズを保持するのに適している。

【0110】

好ましい実施例において、好ましくは、装置21はカートリッジと組み合わせて使用され、上記カートリッジは流体試料のための前処理サイトおよび/または溶離された核酸のための後処理サイトを持つ。カートリッジは、また、抵抗型加熱要素34に対して電力を供給するための適当なプロセッシングエレクトロニクスを含んでもよい。一体に形成された微小構造物の配列によってではなく、チャンバ26内の内部吸着表面がビード50のような固形支持体によって提供されるということの外は、装置21の作用は上記の実施例の作用と類似している。

【0111】

装置21は、フォトリソグラフィおよび超微細機械加工を含む前述の実施例に記載された技法と同じものを使用して製造される。装置を作るための好ましい方法が、ここに記載される。

【0112】

100mmのn型(100)の0.1から0.2オームcmのシリコンウエハが、好ましくは、ベース基板22のためのスターティング材料として使用される。ウエハはフォトレジストで前面側においてパターン化されて、DRIE処理のためのエッチマスクを得る。エッチマスクは、基板22の中にチャンバ26を形成するためのチャンバパターンを定め、内部障壁構造物を形成するための障壁パターンを定め、好ましくはチャンバ26内にびっしりと間隔の詰まったコラムを形

成するための障壁パターンを定める。次に、パターン化されたウエハは、DRIE処理を使用してエッチングされて、チャンバ26と内部障壁構造体を形成する。勿論、構造体はビード50の直径よりも小さな間隔を持ち、チャンバ26内にビード26を保持する。

【 0 1 1 3 】

エッチング後、残りのフォトレジストはウエハから除去される。次に、1以上の電氣的に伝導性のある材料が基板の背面側に析出されパターン化されて、抵抗型加熱要素と温度センサと結合パッドとを形成する。基板は、流体ポート28、30を形成する孔を持ったガラスカバーに陽極結合される。ビード50は、カバーを取付ける前または後に、好ましくはカバーが取付けられた後に、チャンバ内に詰められる。ビード50は、入口ポート28を通して挿入される。勿論、障壁52は、ビード50を詰め込む前に正規の位置に置いてビードがチャンバから流出するのを防ぐ。

【 0 1 1 4 】

図15は、本発明の別の実施例による貫流装置31を示し、チャンバの中に収容された固形支持体は、核酸を捕獲するための膜またはフィルタ60を備えている。装置31は、ベース基板58と、トップ基板54と、トップ基板とベース基板の間に挟まれたミドル基板56とを含んでいる。抽出チャンバ26は、トップ基板54とベース基板58とに形成される。フィルタ60はヒータ34と熱的な接触する。この代わりに、フィルタ60は出口ポート30に隣接してベース基板58に配置されてもよい。

【 0 1 1 5 】

抵抗型加熱要素34は、好ましくは、チャンバ26を加熱するためのミドル基板56に配置される。加熱要素34は、チャンバ26を流れる流体から加熱要素34を保護するために、例えば二酸化けい素、シリコンカーボネイト、窒化シリコン、プラスチック、膠または他のポリマー、レジスト、セラミックといった絶縁材料の層62によって覆われる。ミドル基板56は、加熱要素34の周りに配置された孔（図15の断面図に示さず）を含んでいて、流体はチャンバを通過して入口ポート28から出口ポート30に連続的に流れる。

【 0 1 1 6 】

加熱要素 3 4 は、基板上にパターン化された金属またはポリシリコンの薄いフィルムであってもよい。この代わりに、基板 5 6 は加熱要素 3 4 を持つ薄いプラスチックのフレックス回路であってもよい。他の実施形態では、加熱要素 3 4 は、基板 5 6 に取付けられたエッチングされた箔加熱要素のような積層の加熱源を備える。ヒーターが積層構造物の一部である実施形態では、基板 5 6 はヒーターのための支持体である。さらに別の実施形態では、例えば薄膜処理のような当業者に知られた技法を用いて、基板 5 6 と 5 8 は、加熱要素 3 4 と絶縁体層 6 2 と共に、単一基板から製造され得る。装置 3 1 は、好ましくは、カートリッジと組合わせて使用され、上記カートリッジは流体試料のための前処理サイトおよび／または溶離された核酸のための後処理サイトを持つ。カートリッジは、また、抵抗型加熱要素 3 4 に対して電力を供給するための適当なプロセッシングエレクトロニクスを含んでもよい。作動時には、流体試料は強制的に装置内を流れる。流体試料がチャンバ 2 6 内を流れるとき、核酸はフィルタ 6 0 に接触し付着する。チャンバは不要な微粒子を除去するために随意に洗浄される。核酸を溶離するために、溶離流体がチャンバ内に流れるとき、チャンバ 2 6 は加熱要素 3 4 によって加熱され、核酸をフィルタ 6 0 から溶離流体に放出する。

【 0 1 1 7 】

トップ基板 5 4 とベース基板 5 8 とは、好ましくは、低コストで成形されたプラスチック部品であって、ミドル基板 5 6 は、好ましくは、プラスチックフレックス回路である。フィルタ 6 0 を所定寸法に予め切断し、次に例えば膠のような接着剤や超音波溶接のような溶接によって、フィルタ 6 0 と基板 5 4、5 6、5 8 とを組み立てて、装置 3 1 は製造される。

【 0 1 1 8 】

(概要、細分化関連問題、範囲)

上記記載は多くの特殊性を含んでいるが、これらは本発明の範囲を限定するものとして解釈+されるべきではなく、単に現在の幾つかの好ましい実施形態の例に過ぎない。本発明の多くの他の実施形態が可能である。例えば、1つの代替実施形態においては、チャンバの内部吸着表面は、交流または直流の電圧で帯電さ

れて、核酸を誘引および/または溶離する。本発明は、核酸を十分に溶離するのに必要な溶離容積を減少させるために、化学泳動と加熱泳動と電気泳動を含む1つ以上の溶離技法の組み合わせが可能である。別の実施形態では、核酸は吸着表面に結合された後に処理される。例えば、レポート分子を持つ二次結合部材が抽出チャンバを通過して、既に結合された核酸に結合する。次に、この複合体は溶離される。さらに、細胞、バクテリア、ウィルスあるいは特定核酸といった特定の標的を結合させる特定の捕獲成分で、チャンバは機能化される。

【 0 1 1 9 】

吸着面を直接かつ急速に加熱するには、チャンバ壁に結合された抵抗器を使用して、チャンバを加熱することが好ましい。しかしながら、本発明はこの実施形態に限定されない。チャンバを加熱するための多くの異なる機構または方法が、当業者には明らかである。これらには、光学的加熱、超音波加熱、誘導結合コイル、マイクロウェーブまたはチャンバを加熱するための他の適当な機構が含まれる。さらに、装置がカートリッジと組み合わせて使用されるとき、カートリッジまたはカートリッジを処理するために使用される機器は、装置を過熱するためのヒーターを含んでいる。

【 0 1 2 0 】

目下、カートリッジと組み合わせて本発明の貫流装置を使用することが好ましいが、本発明の範囲はこの実施形態に限定されるものではない。この装置は化学分析システムに接続され得るという上記記載内容を考慮すると、この代わりに、この装置が流体試料から所望の物質を抽出するための単独型装置として使用され得ることは、当業者には明らかである。さらに、核酸の抽出が本発明の例示的实施形態として提示されているが、有機体、細胞、プロテイン、炭水化物、ウィルス粒子、バクテリア、化学薬品、生物化学製剤などの流体試料から多くの他の所望の物質を分離するために、本発明の装置が使用され得ることは当業者には明らかである。

【 0 1 2 1 】

したがって、本発明の範囲は、当請求項（クレーム）およびそれらの法的相等物によって決定されなければならない。

【図面の簡単な説明】

図 1 A ～ 1 H は、本発明の装置の走査型電子顕微鏡写真であり、シリコンにおいてエッチングされた異なる配列の微小構造体を例示している。

【図 1】 入口ポートと出口ポートとを有するチャンバの中に配置されたマイクロコラムの配列を示す。

【図 2】 図 1 A のマイクロコラムの配列の一部分の拡大図である。

【図 3】 先端を有するマイクロコラムの異なる配列を示す。

【図 4】 チャンバの一端にフィルタを形成している単一系列の微小構造体を示す。

【図 5】 1 つの共通溝に収束している 6 つの溝を示す電子顕微鏡写真である。

【図 6】 中に一連のピラーを配置させた 1 つの共通溝に合流する 2 つの溝を示す。

【図 7】 液相分離に適した別の溝切された装置を示す。

【図 8】 流動血球計算に有用な流体力学的焦束装置を示す。

【図 9】 2 つの流体の拡散混合のために 2 つの深溝が合流して 1 つの共通溝になる装置の 3 次元図である。

【図 10】 2 つの流体の拡散混合のために 2 つの深溝が合流して 1 つの共通溝になる別の装置の 3 次元図である。

【図 11】 流体に対して多数の相互拡散領域を提供する合流溝のネットワークを有する装置の概略平面図である。

【図 12】 中に一連のピラーが配置させた 1 つの共通溝に合流する 2 つの溝を有する代替の装置の 3 次元図である。

【図 13】 本発明の好ましい実施形態による流体試料から所望の物質を抽出するための貫流装置の概略断面図である。

【図 14】 図 6 の装置の底面図である。

【図 15】 図 6 の装置の抽出チャンバに形成されたマイクロコラムの 3 次元図である。

【図 16】 図 6 の装置におけるマイクロコラムの概略平面図である。

【図17】 図6の装置における2つの隣接するマイクロコラムの平面図である。

【図18】 図6の装置の製造に使用されるチャンバパターンとコラムパターンとを形成するエッチマスクの概略図である。

【図19】 本発明の好ましい実施形態による図6の装置を含むカートリッジの概略平面図である。

【図20】 本発明の代替の実施形態による流体試料から所望の物質を抽出するための貫流装置の概略断面図である。

【図21】 本発明の別の実施形態による流体試料から所望の物質を抽出するための貫流装置の概略断面図である。

【図22】 本発明のさらに別の実施形態による流体試料から所望の物質を抽出するための貫流装置の概略断面図である。

【符号の説明】

- 20…貫流装置
- 26…抽出チャンバ、
- 28…入口ポート、
- 30…出口ポート、
- 32…コラム、
- 34…ヒーター、
- 48…電極、
- 101…カートリッジ、
- 119…フィルタサイト、
- 109、125、127…貯蔵サイト、
- 139…廃棄サイト、
- 141…試薬サイト、
- 143…反応サイト、
- 151…プロセッシングエレクトロニクス。

【 図 1 A 】

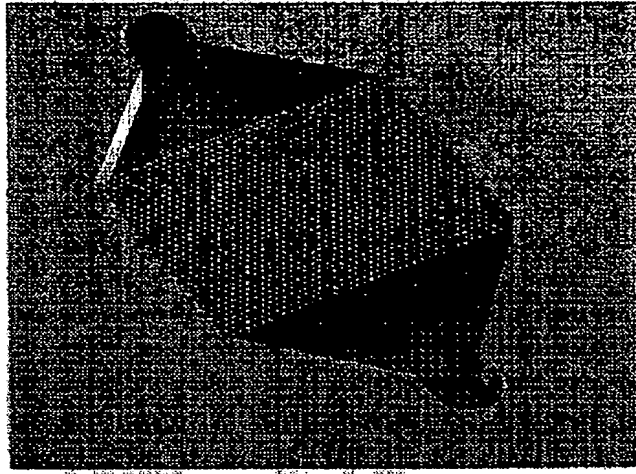


FIG. 1A

【 図 1 B 】

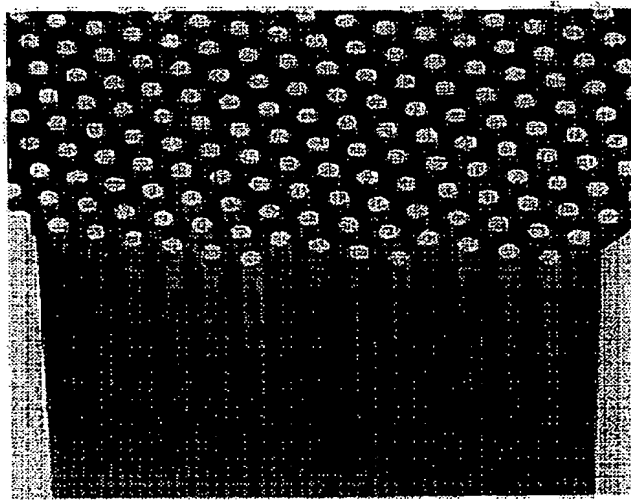


FIG. 1B

【 図 1 C 】

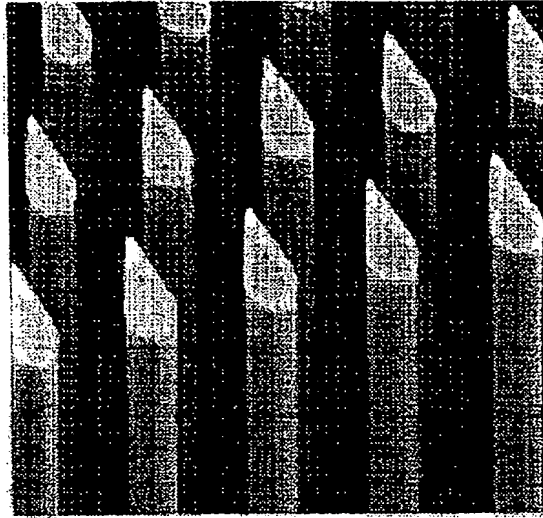


FIG. 1C

【 図 1 D 】

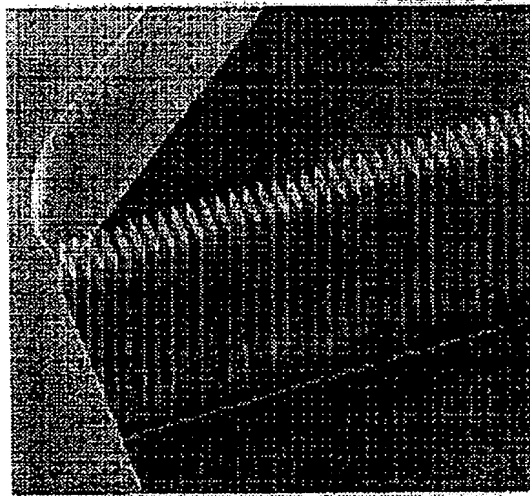


FIG. 1D

【 図 1 E 】

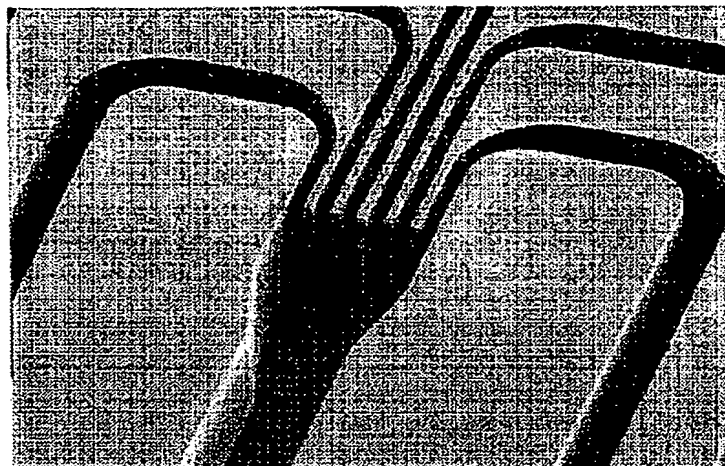


FIG. 1E

【 図 1 F 】

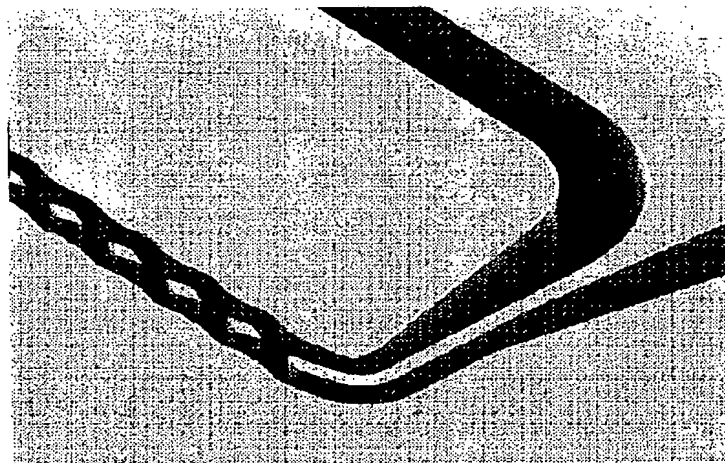


FIG. 1F

【 図 1 G 】

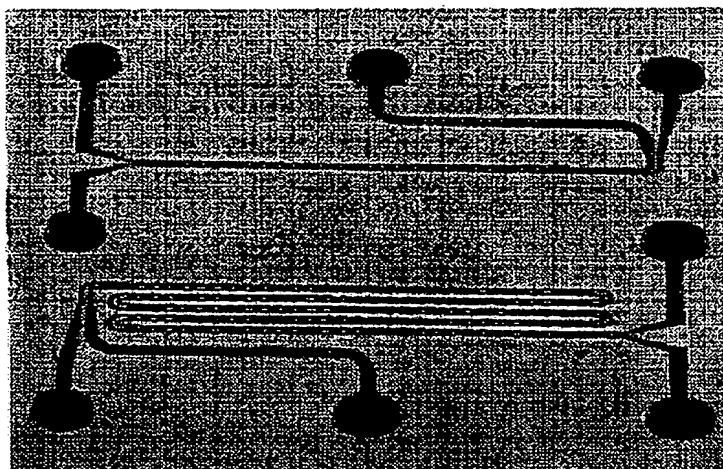


FIG. 1G

【 図 1 H 】

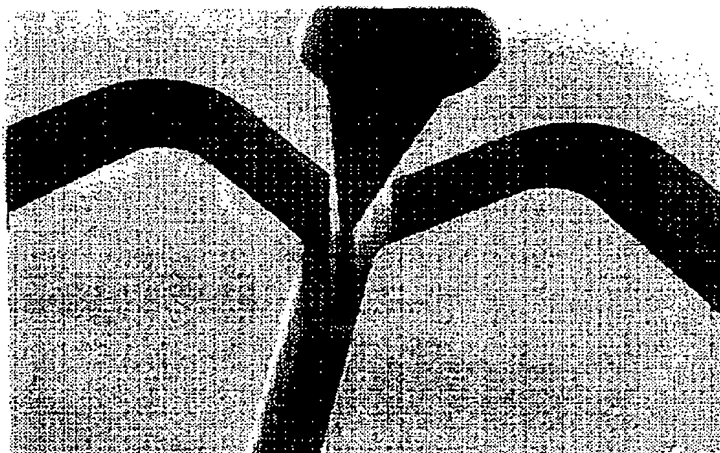


FIG. 1H

【 図 2 】

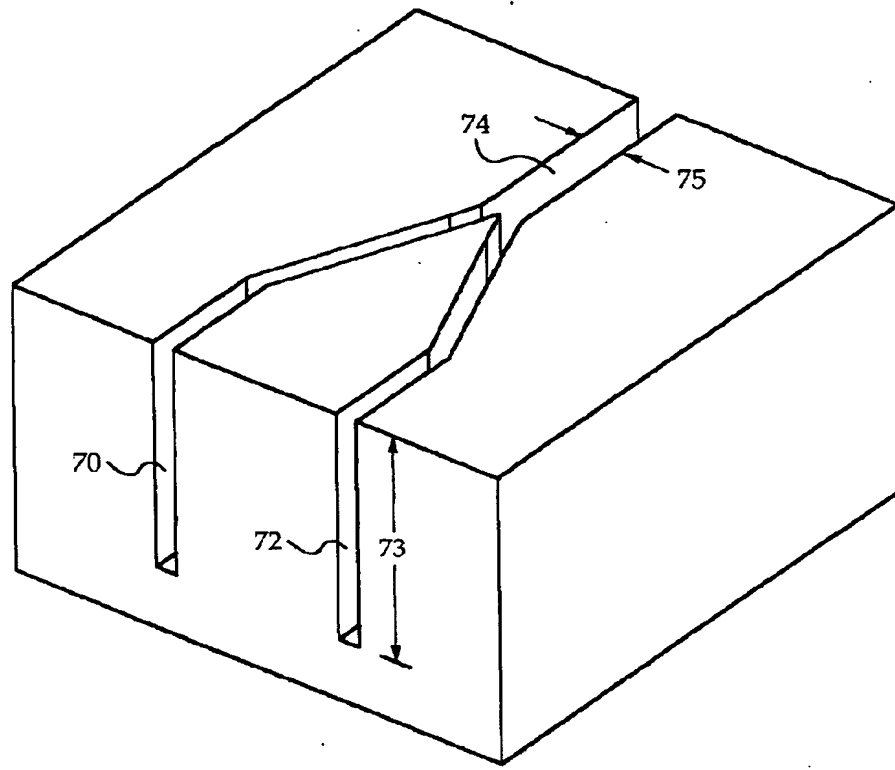


FIG. 2

【 図 3 】

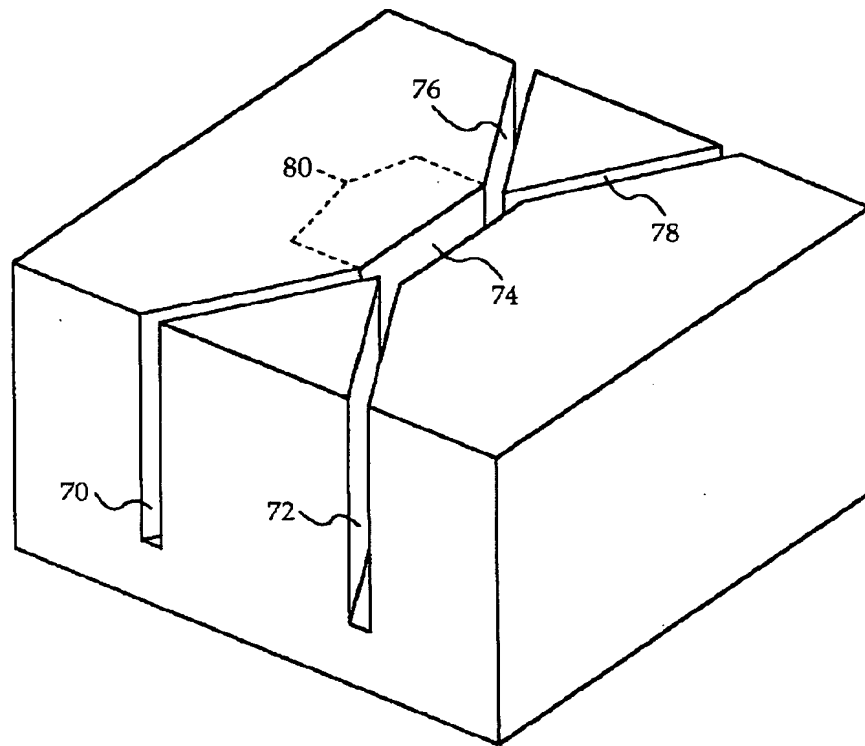


FIG. 3

【 図 4 】

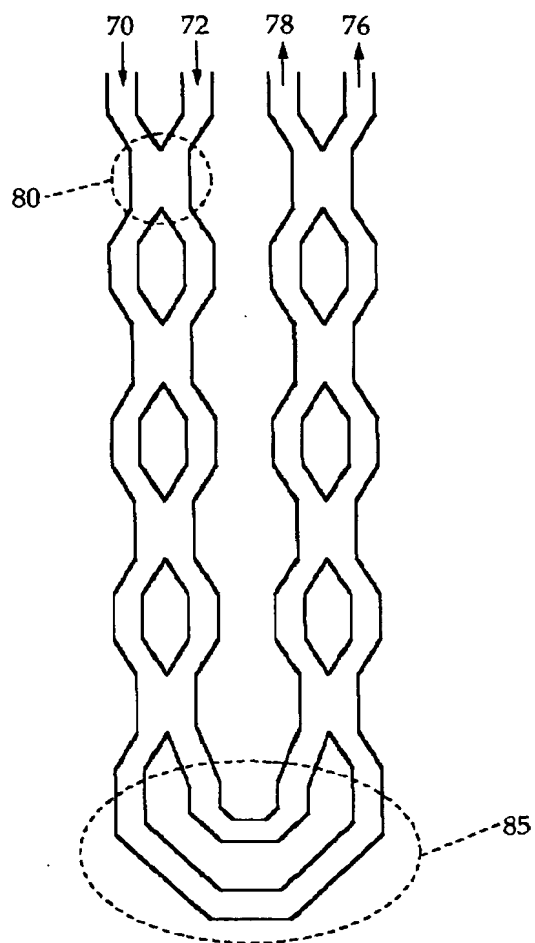


FIG. 4

【 図 5 】

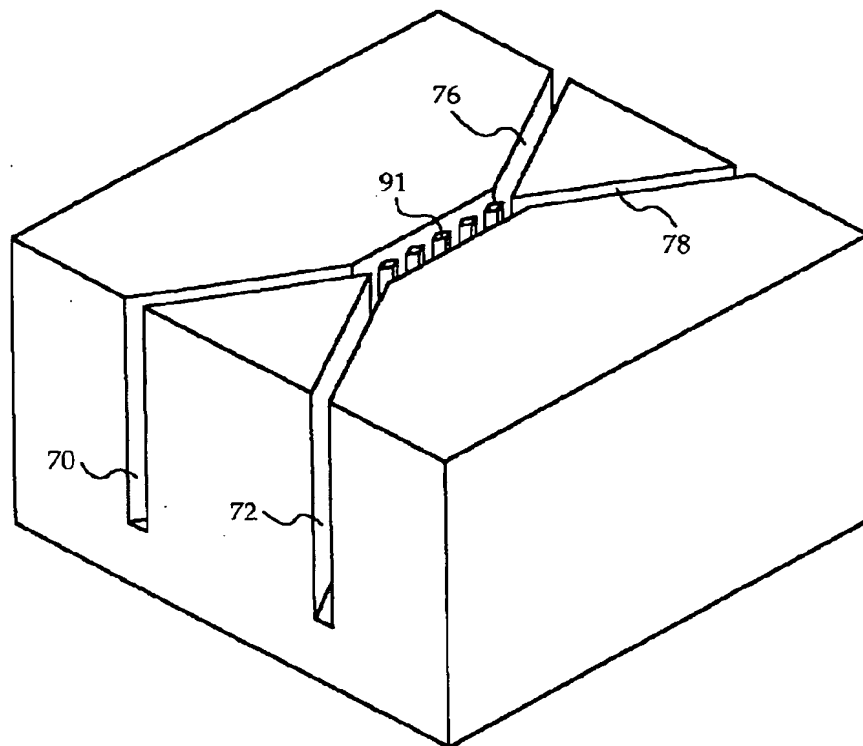


FIG. 5

【 図 6 】

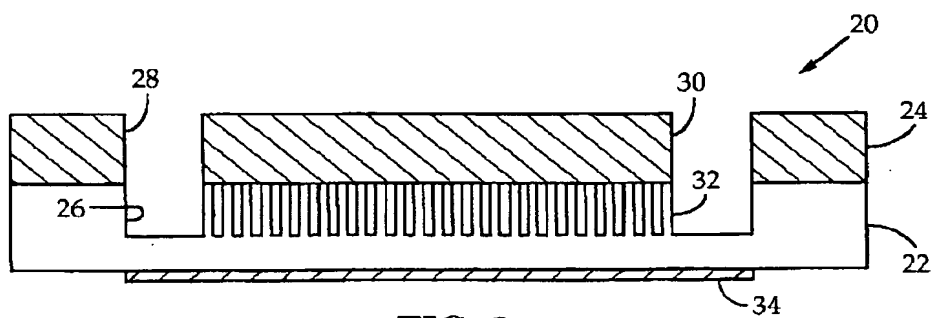


FIG. 6

【 図 7 】

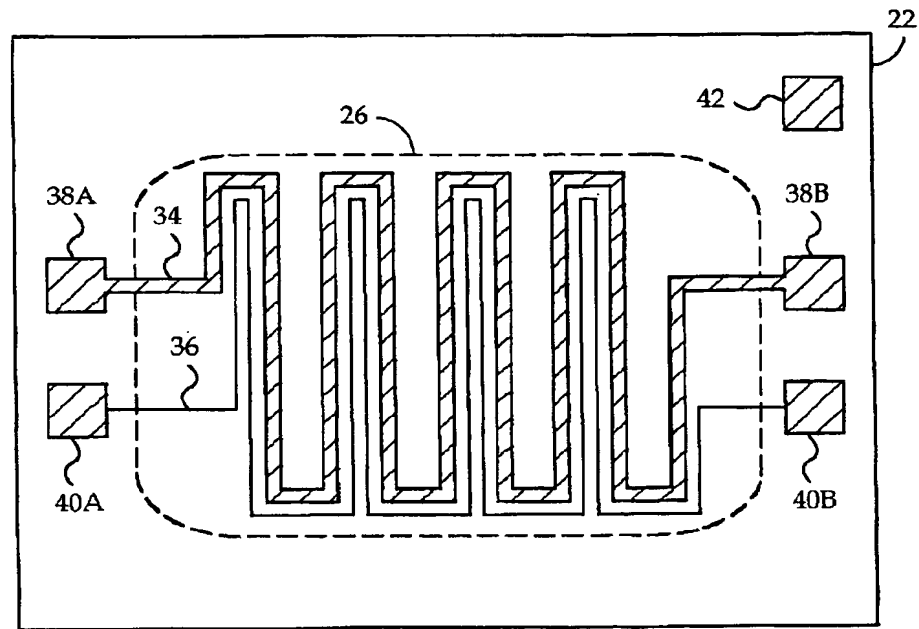


FIG. 7

【 図 8 】

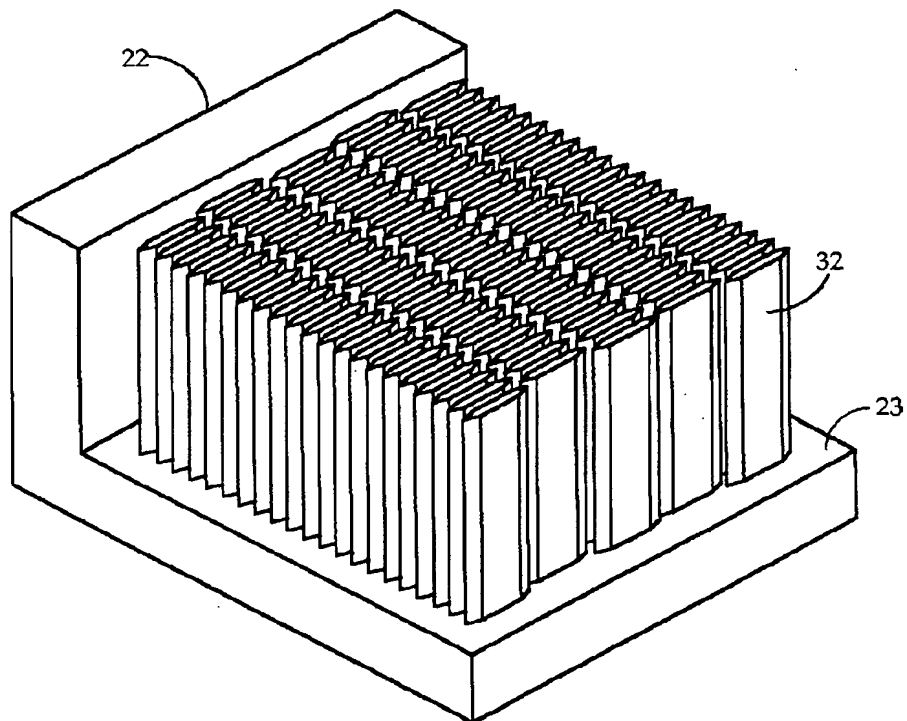
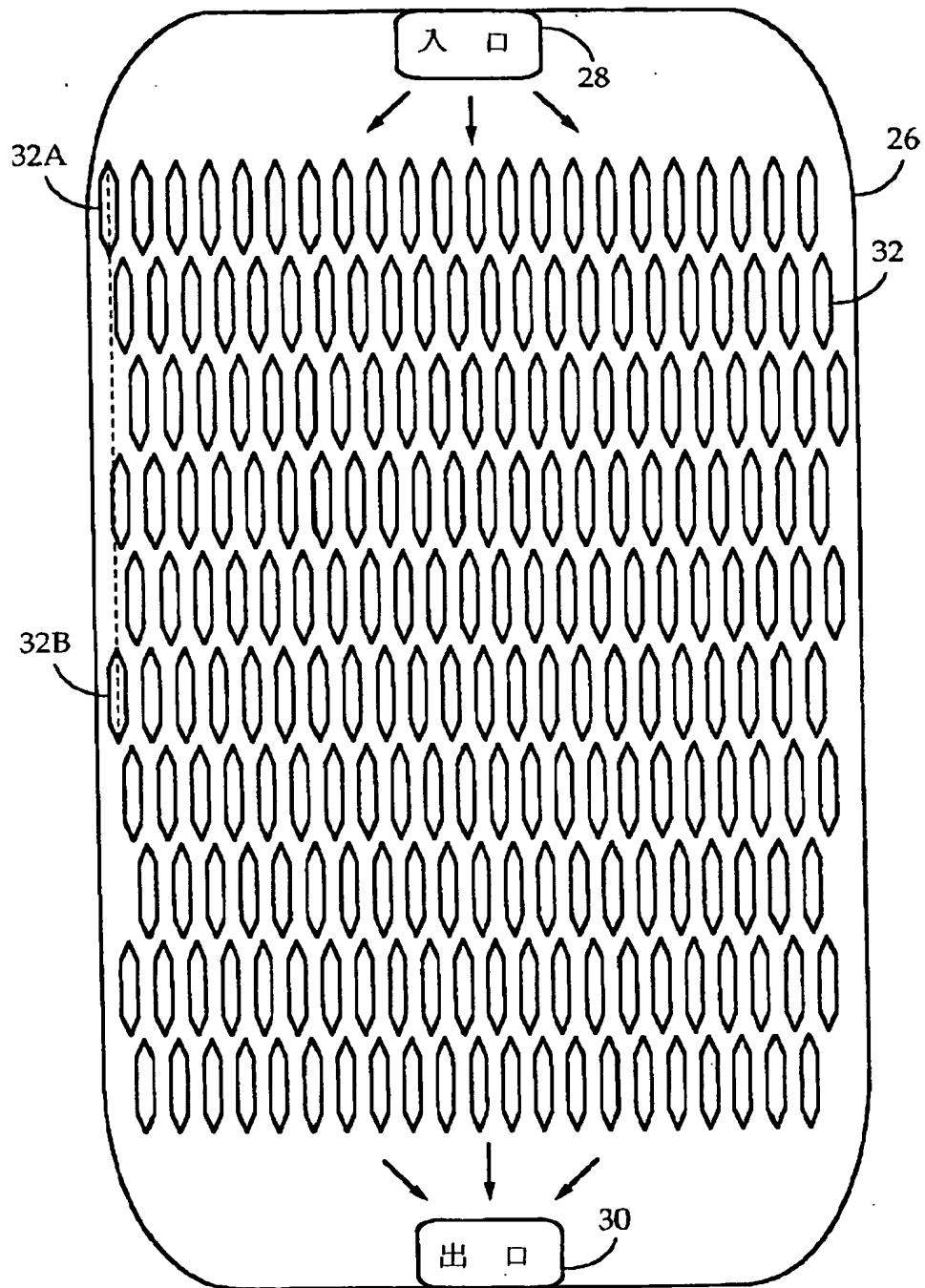


FIG. 8

【 図 9 】



【 図 10 】

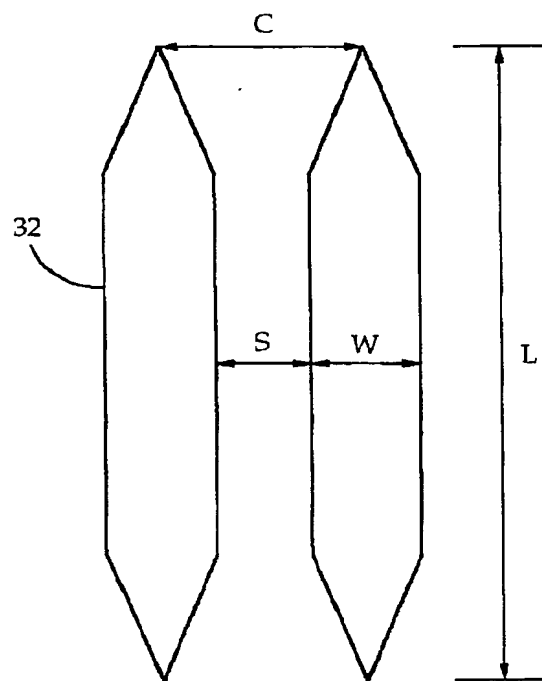


FIG. 10

【 図 1 1 】

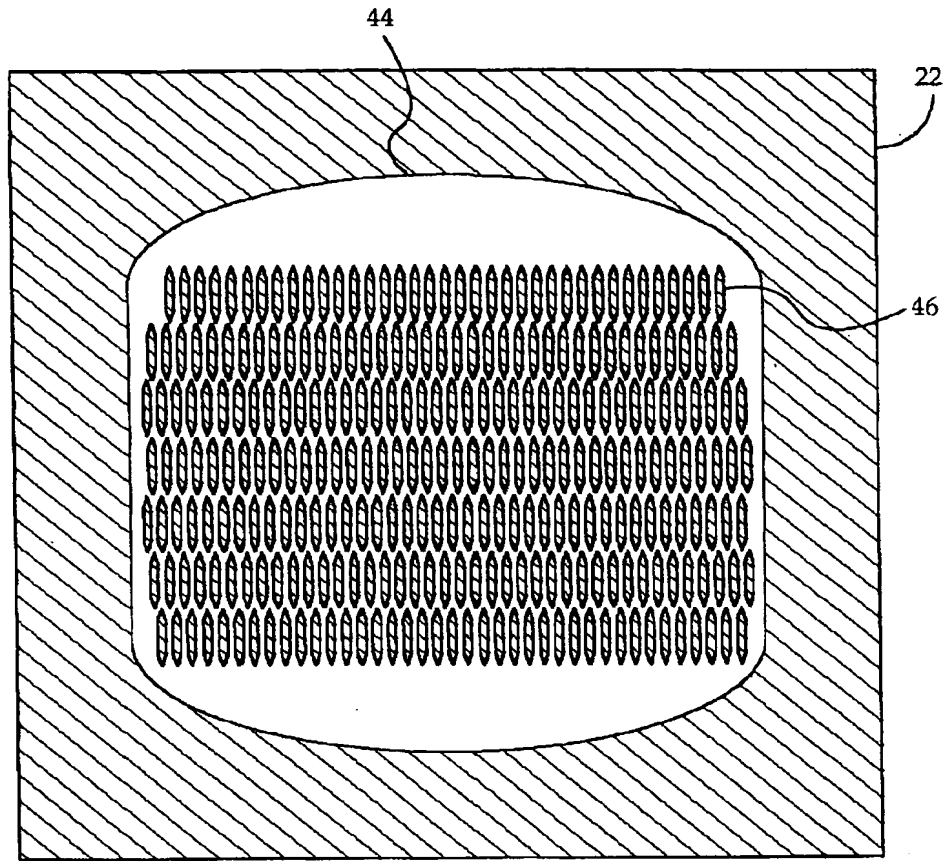
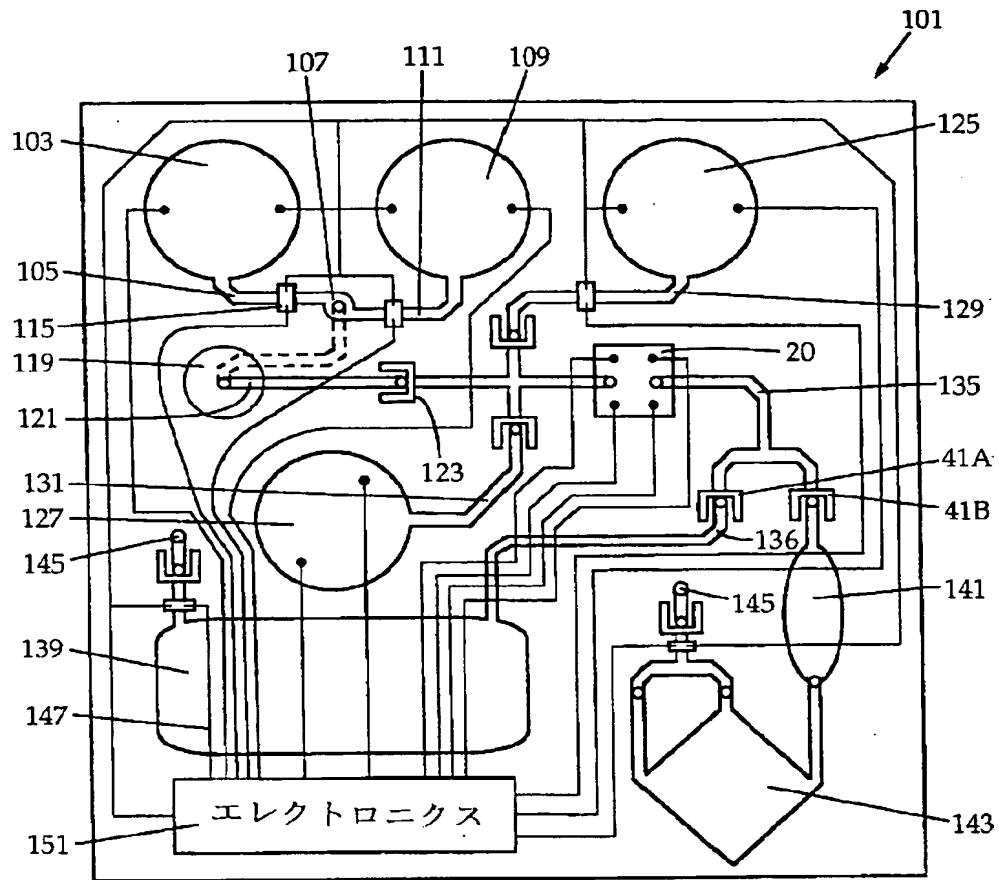


FIG. 11

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

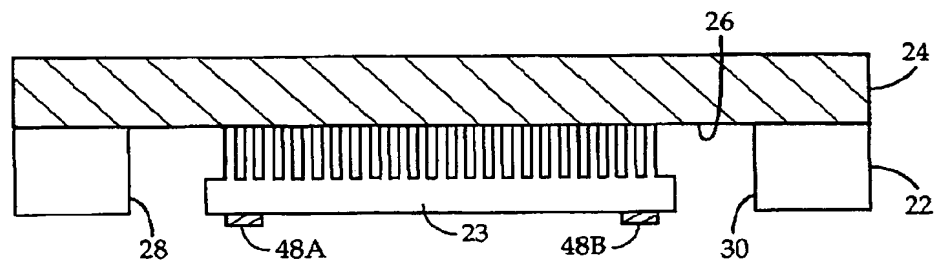
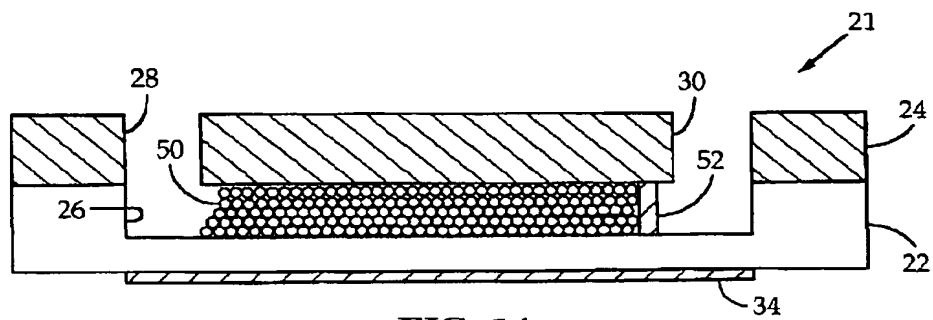
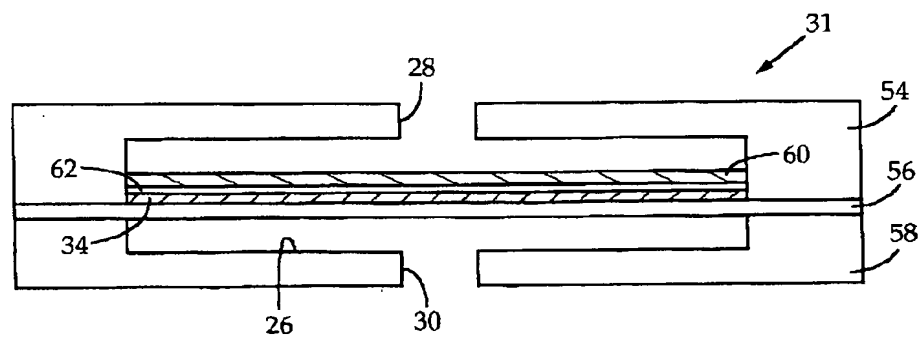


FIG. 13

【 図 1 4 】

**FIG. 14**

【 図 1 5 】

**FIG. 15**

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年2月14日(2000.2.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 流体試料から所望の物質を分離し、上記物質を濃縮して或る容積の溶離流体に入れるための微小流体装置において、上記装置は本体を備え、
a) 上記試料を上記本体に導入し、続いて上記溶離流体を上記本体に導入するための少なくとも1つの入口ポートと、
b) 上記本体から上記試料と上記溶離流体を出すための少なくとも1つの出口ポートと、
c) 上記入口ポートと上記出口ポートを流体で連通するチャンバとを上記本体の中に形成し、上記出口ポートと上記入口ポートとは上記チャンバを通して上記本体から出る上記試料の連続的な流れと上記溶離流体の連続的な流れを可能するように配置され、
d) 上記チャンバの少なくとも1つの壁に一体に形成されると共に上記チャンバの中に伸びているコラムの配列を上記本体の中に形成して、上記試料が上記チャンバを流れるとき上記所望の物質を上記流体試料から捕獲し、続いて、上記溶離流体が上記チャンバを流れるとき上記捕獲された物質を上記溶離流体の中に放出し、上記コラムの各々は少なくとも2:1のアスペクト比を持っていることを特徴とする微小流体装置。

【請求項2】 請求項1に記載の装置において、上記溶離流体が上記チャンバを流れるとき上記コラムを加熱するための少なくとも1つの加熱要素をさらに備えていることを特徴とする装置。

【請求項3】 請求項2に記載の装置において、上記加熱要素は上記チャンバの少なくとも1つの壁に結合された抵抗型加熱要素を備えていることを特徴と

する装置。

【請求項4】 請求項2に記載の装置において、上記本体は電氣的に伝導性があり、上記加熱要素は上記チャンバを形成している上記本体の少なくとも一部分に電位差を印加するための電極を備えていることを特徴とする装置。

【請求項5】 請求項2に記載の装置において、上記加熱要素は超音波ヒーターを備えていることを特徴とする装置。

【請求項6】 請求項1に記載の装置において、上記コラムに超音波エネルギーを伝えるための手段をさらに備え、これによって上記コラムに振動を引き起こすことを特徴とする装置。

【請求項7】 請求項1に記載の装置において、上記コラムを撓ませるために上記本体に結合された圧電性要素を備えていることを特徴とする装置。

【請求項8】 請求項1に記載の装置において、上記本体に結合された第1電極と上記チャンバに配置された第2電極とをさらに備え、上記チャンバ内のコラムと流体との間に電圧差を設けて、上記所望の物質を捕獲または溶離することを特徴とする装置。

【請求項9】 請求項1に記載の装置において、上記コラムの各々は少なくとも4:1のアスペクト比を有していることを特徴とする装置。

【請求項10】 請求項1に記載の装置において、上記コラムの各々は少なくとも4:1の断面の長さとの幅の比を有していることを特徴とする装置。

【請求項11】 請求項1に記載の装置において、上記装置は上記配列の中に少なくとも1,000個のコラムを含んでいることを特徴とする装置。

【請求項12】 請求項1に記載の装置において、上記コラムは上記チャンバの底部壁と一体に形成されていると共に上記底部壁から実質的に垂直に延在し、上記コラムの各々は上記チャンバの深さと実質的に等しい高さを有して上記流体試料の全容積を上記コラムの間に強制的に流すことを特徴とする装置。

【請求項13】 請求項1に記載の装置において、上記コラムは列になして配置され、上記各列のコラムは実質的に均一な中心と中心の間隔を有し、上記各列のコラムが、少なくとも1つの隣接する列のコラムから、上記隣接する列のコラムの中心と中心の間隔の半分よりも大きな距離または小さい距離だけオフセッ

【請求項 14】 請求項 1 に記載の装置において、各列のコラムが少なくとも 2 つ前の列または後の列のコラムと一直線上に並ばないように、上記列が配置されていることを特徴とする装置。

【請求項１５】 請求項１に記載の装置において、上記所望の物質は核酸を備え、上記核酸を捕獲するために上記コラムの表面は二酸化けい素を備えていることを特徴とする装置。

【請求項 16】 請求項 1 に記載の装置において、上記装置は上記流体試料のための前処理サイトを有するカートリッジと結合し、且つ、上記装置は上記カートリッジに挿入されて上記入口ポートが上記前処理サイトと流体で連通するように作られていることを特徴とする装置。

【請求項 17】 請求項 1 に記載の装置において、上記装置は溶離物質のため
の後処理サイトを有するカートリッジと結合し、且つ、上記装置は上記カート
リッジに挿入されて上記出口ポートが上記後処理サイトと流体で連通するよう
に作られていることを特徴とする装置。

【請求項 18】 流体試料から所望の物質を分離し、上記物質を濃縮して或る容積の溶離流体に入れるための方法において、

a) チャンバと上記チャンバの少なくとも 1 つの壁と一体に形成されたコラムの配列とを有する微小流体装置を設けるステップを備え、上記コラムの各々は少なくとも 2 : 1 のアスペクト比を有し、上記コラムの表面は上記所望の物質と十分な結合親和力を有して上記試料が上記チャンバを通して流れるとき上記物質を捕獲し、

b) 上記所望の物質を上記コラムの表面に結合させるために、上記チャンバを通して強制的かつ連続的に上記試料を流すステップを備え、上記チャンバを通して強制的に流される試料の容積と上記チャンバの最大収容容積との比は少なくとも 2 : 1 であり、

c) 上記チャンバを通して強制的に上記溶離流体を流すステップを備え、これによって上記コラムの表面から上記溶離流体に上記物質を放出させることを特徴とする方法。

【請求項19】 請求項18に記載の方法において、上記チャンバを通して強制的に上記溶離流体を流す間、上記コラムを加熱するステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項19に記載の方法において、上記コラムは60度Cから95度Cの範囲の温度に加熱されることを特徴とする方法。

【請求項21】 請求項18に記載の方法において、上記チャンバを通して強制的に試料を流すステップの後、且つ、上記溶離流体を上記チャンバに強いて流すステップの前に、ガスを上記チャンバに強いて流すステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項22】 請求項18に記載の方法において、上記チャンバを通して強制的に流される試料の容積と上記チャンバの最大収容容積との比は少なくとも10：1であることを特徴とする方法。

【請求項23】 請求項18に記載の方法において、上記チャンバを通して強制的に流される試料の容積は少なくとも1mlであることを特徴とする方法。

【請求項24】 請求項18に記載の方法において、上記物質を誘引あるいは溶離するために上記コラムの表面を帯電させるステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項25】 請求項18に記載の方法において、上記コラムを振動に引き起こすために超音波エネルギーを上記コラムに伝えるステップをさらに備え、これによって上記物質の捕獲と放出を増大させることを特徴とする方法。

【請求項26】 流体試料から所望の物質を分離し、上記物質を濃縮して或る容積の溶離流体に入れるための微小流体装置において、

a) 本体を備えて、上記本体は

i) チャンバと、

ii) 上記試料を上記チャンバに導入し、続いて上記溶離流体を上記チャンバに導入するための少なくとも1つの入口ポートと、

iii) 上記チャンバから上記試料と上記溶離流体を出すための少なくとも1つの出口ポートとを有し、上記出口ポートと上記入口ポートとは上記チャンバを通る上記試料の連続的な流れと上記溶離流体の連続的な流れを可能にするように

配置され、

- b) 上記チャンバ内に入れられた少なくとも1つの固形支持体を備えて、上記試料が上記チャンバを通過して連続的に流れるとき上記試料から上記物質を捕獲し、
- c) 上記溶離流体が上記チャンバを通過して流れるとき上記チャンバを加熱するためのヒーターを備えて、これによって上記固形支持体を上記溶離流体に捕獲された物質を放出させることを特徴とする微小流体装置。

【請求項27】 請求項26に記載の装置において、上記固形支持体は、ビードとファイバと膜とグラスウールとフィルタペーパーとゲルとから成るグループから選択された支持物を備えていることを特徴とする装置。

【請求項28】 請求項26に記載の装置において、上記ヒーターは、上記チャンバの少なくとも1つの壁に結合された抵抗型加熱要素を備えていることを特徴とする装置。

【請求項29】 請求項26に記載の装置において、上記本体は電気的に伝導性があり、上記ヒーターは電極を備えて、上記チャンバを形成している上記本体の少なくとも一部分に電位差を印加していることを特徴とする装置。

【請求項30】 請求項26に記載の装置において、上記ヒーターは超音波ヒーターを備えていることを特徴とする装置。

【請求項31】 流体試料から所望の物質を分離し、上記物質を濃縮して或る容積の溶離流体に入れるための方法において、

- a) チャンバと上記チャンバの中に配置された少なくとも1つの固形支持体を有する微小流体装置を設けるステップを備え、上記試料が上記チャンバを通過して流れるとき上記所望の物質を捕獲し、
- b) 上記チャンバを通過して強制的かつ連続的に上記試料を流すステップを備え、これによって上記所望の物質を上記固形支持体に結合させ、上記チャンバを通過して強制的に流される試料の容積と上記チャンバの最大収容容積との比は少なくとも2:1であり、
- c) 上記チャンバを通過して強制的に上記溶離流体を流す間に上記チャンバを加熱するステップを備え、これによって上記固形支持体から上記溶離流体に上記物質を放出させることを特徴とする方法。

【請求項32】 請求項31に記載の方法において、上記チャンバは60度Cから95度Cの範囲の温度に加熱されることを特徴とする方法。

【請求項33】 請求項31に記載の方法において、上記チャンバを通して強制的に上記試料を流すステップの後、且つ、上記チャンバを通して強制的に上記溶離試料を流すステップの前に、上記チャンバを通して強制的にガスを流すステップをさらに備えていることを特徴とする方法。

【請求項34】 請求項31に記載の方法において、上記チャンバを通して強制的に流される試料の容積と上記チャンバの最大収容容積との比は少なくとも10:1であることを特徴とする方法。

【請求項35】 請求項31に記載の方法において、上記チャンバを通して強制的に流される試料の容積は少なくとも1mlであることを特徴とする方法。

【請求項36】 流体を操作するための微小流体装置であって、
少なくとも第1流体と第2流体とをそれぞれ通す第1溝と第2溝とを有し、上記第1溝と上記第2溝はこれらの流体流の接触領域を提供する共通溝に集まり、上記溝の各々はその幅より大きな深さを有し、上記第1溝と第2溝に流れる流体は上記共通溝に流れ込んで、上記共通溝の中で並んで流れる少なくとも2つの垂直な流体シースを形成することを特徴とする装置。

【請求項37】 請求項36に記載の装置において、上記共通溝に配置されたピラーを備えて上記流体流の安定性を増大させていることを特徴とする装置。

【請求項38】 請求項36に記載の装置において、上記第1溝と上記第2溝とは複数の共通溝に合流して、対応した複数の接触領域を上記流体流に対して提供し、上記共通溝の各々はその幅よりも大きな深さを有していることを特徴とする装置。

【請求項39】 請求項36に記載の装置において、上記共通溝は少なくとも1回の180度回転をさせることを特徴とする装置。

【請求項40】 請求項36に記載の装置において、上記共通溝は10μmから1,000μmの範囲の深さと5μmから50μmの範囲の幅とを有していることを特徴とする装置。

【請求項41】 請求項36に記載の装置において、上記接触領域から離れ

て上記共通溝と流体で連通している第3溝と第4溝とをさらに備えて、上記第1流体流と上記第2流体流とをそれぞれ通すことを特徴とする装置。

【請求項42】 請求項36に記載の装置において、上記溝の各々は少なくとも5:1の内部表面積と外面表面積の比を有することを特徴とする装置。

【請求項43】 請求項36に記載の装置において、上記溝の各々は少なくとも10:1の内部表面積と外面表面積の比を有することを特徴とする装置。

【請求項44】 請求項36に記載の装置において、上記溝の各々は少なくとも20:1の内部表面積と外面表面積の比を有することを特徴とする装置。

【請求項45】 流体を操作するための装置であって、
a) 第1溝と、
b) 上記第1溝から分岐している第2溝と第3溝とを上記装置の中に形成して、上記第1溝に流れる流体を少なくとも2つの流体流に分離し、上記溝の各々はその幅より大きな深さを有することを特徴とする装置。

【請求項46】 請求項45に記載の装置において、上記溝の各々は少なくとも5:1の内部表面積と外面表面積の比を有することを特徴とする装置。

【請求項47】 請求項45に記載の装置において、上記溝の各々は少なくとも10:1の内部表面積と外面表面積の比を有することを特徴とする装置。

【請求項48】 請求項45に記載の装置において、上記溝の各々は少なくとも20:1の内部表面積と外面表面積の比を有することを特徴とする装置。

【請求項49】 請求項45に記載の装置において、上記溝の各々は10 μ mから1,000 μ mの範囲の深さと5 μ mから50 μ mの範囲の幅とを有していることを特徴とする装置。

【手続補正2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0007

【補正方法】 変更

【補正内容】

【0007】

従来のベンチトップ測定技法に代るものとして、自動化された微小流体装置を

開発するという試みがなされて来ており、上記装置は試料準備機能および／または試料処理機能の内の幾らかをこなす。微小流体システムは、ベンチトップ測定と比較して、軽便性、再生産性の向上、汚染の減少、試薬消費の減少、操作者介在の減少、低測定コストという可能性を持っている。マイクロ機械加工の技術は、例えば半導体基板を使用して、微小流体装置の製造を可能にし、マイクロリットルからピコリットルの容積の試料を操作したり、反応させたり、検知したりすることができる。例えば、ノースロップらの米国特許第5,639,423号およびウィンディング米国特許第5,587,128号は、生物化学反応を行なうための超微細製作された装置を、特にポリメラーゼ連鎖反応のようなDNAベースの反応を行なうための反応器（PCR）を開示している。試験サンプル内の分析物の存在あるいは量を測定するもう1つの分析装置は、ハンスマンによる1996年4月11日に発行された国際公開番号第WO96/10747号に記載されている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】

しかしながら、これらの微小流体技術における進歩にも拘わらず、比較的大きな容積の流体試料から核酸を有効に抽出でき、且つ、次の分析処理のために核酸を小さな容積に濃縮できる微小流体装置のニーズが相変わらずある。特に診断への適用においては、例えば病原性器官または癌細胞など、数ミリリットル以上の比較的大きな容積の試料から低濃度の核酸を抽出し濃縮することが頻繁に必要な。この種の処置は、例えば、食物中の有毒大腸菌0157（食物10グラム当たり1生物体のレベルで有毒）、血液中のHIV（血液1ミリリットル当たり200ウィルス生物体以下）、細菌戦シナリオ中の炭疽菌（空気1リットル当たり100生物体以下）、血液又は尿中の癌細胞（流体1ミリリットル当たり10細胞以下）、性病（例えば淋病やクラミジア）の尿中の病原体（流体1ミリリッ

トル当たり100生物体以下)の検出に必要となる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】

流体の混合は、殆どの生化学分析的な詳細計画（プロトコル）において、共通且つ重大な事象である。従来の巨視的規模では、2つ以上の流体の混合を行なうために、ピペットや渦巻装置や吸引／分配ロボット工学を含めて、様々な有効な手段が存在する。しかしながら、微小流体システムでは、流体の混合が困難であることは周知のことである。この問題は、殆どの微小流体システムにおいて、レイノルズ数が一般に非常に小さく（100未満）、流れが実質的に常に層状であるという事実から生じている。レイノルズ数は、密度×速度×溝幅／粘度である。微小流体システムでは、溝幅が非常に小さいので、レイノルズ数は小さい。巨視的なシステムでは、乱流が始まる前は、レイノルズ数は約2300以上であるに違いない。微小流体システムでは、流体流が実質的に決して乱流とならないので、混合はほぼ完全に拡散によって起こる。ホルメスらは、1996年5月2日に発行された国際公開番号第WO96／12541号において、非混合性流体の間の拡散移動のための方法と装置を記載している。不幸にも、拡散による混合は非常に遅い場合がある。一例としては、深さが300 μ m、幅が600 μ mの「ジグザグ」溝がある。この溝は100mmの流長のみで流体を完全に混合させる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】

本発明は、流体を迅速かつ有効に拡散混合したり、従来の攪拌ベースの液相分離法と同じプロテイン抽出機能を行なうための手段を与える人工のエマルジョンを作ったりするのに有用な非常に大きな微小流体界面を産出するのに適した微小装置を提供する。流体の効率的な拡散混合ができる構造とするために、超超微細機械加工された微小流体溝を作るために、新しいプロセス技術が利用できるようになって来ている。深部反応イオンエッチング（DRIE）として知られた方法によって、非常に深く、然も驚くほど狭い溝の形成が可能である。迅速な拡散混合は、このプロセスを用いて、深く垂直な溝に2つの流体を流し、そらを一緒に合流させることによって実現される。これによって2つの薄い垂直のシース（鞘状部）ができ、これらのシースは従来型の溝よりもずっと短い距離の拡散によって混合する。DRIEプロセスを利用した微小溝構造が、液相分離プロセスを支援するべく設計される。図1～5に示されているように、流体溝は固体の基板に様々な外面形態で形成される。図2は、2つの深い溝70、72が1つの共通溝74に合流する装置を示す。溝は、DRIEを用いて、シリコン基板をエッチングして作られる。各溝は、その幅75よりも大きな深さ73を持ち、3：1よりも大きな表面積比を提供する。分離された溝70、72を流れる流体は、共通溝74で合流して2つの並流する薄い流体シースを形成する。幅に対して深くなった溝は、2つの流体が拡散混合するために、流対流の間に大きな界面領域を提供する。図1Eは、6つの深い溝が単一の共通溝に合流する同種の装置の走査型電子顕微鏡写真である。別々の溝を通る流体は、共通溝において合流して6つの並流する流体シースを形成する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No.
IPC 6 B01J19/00 B01L3/00 C12M1/26		PCT/US 98/16870
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 B01J B01L C12M C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 587 128 A (PETER WILDING & LARRY J. KRICKA) 24 December 1996	1,7-10, 14-18, 21, 25-27, 31-35, 37-42
A	see abstract see column 13, line 66 - column 14, line 62 see column 16, line 47 - column 17, line 4 see column 22, line 19 - line 56 see example 2 see claims; figures	11-13, 19,22, 28-30
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 March 1999		12/03/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Stevnsborg, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No
PCT/US 98/16870

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 10747 A (ABBOTT LABORATORIES) 11 April 1996 see page 3, line 21 - line 37 see page 12, line 30 - page 13, line 9 see page 15, line 9 - page 17, line 25 see page 19, line 1 - line 33 see page 22, line 10 - page 24, line 8 see claims; figures	1-9
A	----- EP 0 323 829 A (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 12 July 1989 see the whole document	14-18, 22-27, 31-35, 38,42
A	----- WO 96 14933 A (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 23 May 1996 see the whole document	1,7-9, 16,17, 25-27, 31-34
A	----- BURNS M A ET AL: "MICROFABRICATED STRUCTURES FOR INTEGRATED DNA ANALYSIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, May 1996, pages 5556-5561, XP002058000	
A	----- WO 96 12541 A (CENTRAL RESEARCH LABORATORIES) 2 May 1996 see the whole document -----	38-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/16870

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5587128 A	24-12-1996	US 5498392 A	12-03-1996
		AU 4236996 A	06-06-1996
		AU 698213 B	29-10-1998
		AU 4282896 A	06-06-1996
		AU 4282996 A	06-06-1996
		CA 2181189 A	23-05-1996
		CA 2181190 A	23-05-1996
		CN 1157639 A	20-08-1997
		EP 0739240 A	30-10-1996
		EP 0739423 A	30-10-1996
		JP 9511407 T	18-11-1997
		JP 9509498 T	22-09-1997
		WO 9615269 A	23-05-1996
		WO 9614933 A	23-05-1996
		WO 9614934 A	23-05-1996
		US 5726026 A	10-03-1998
		AT 155711 T	15-08-1997
		AT 167816 T	15-07-1998
		AT 140025 T	15-07-1996
		AT 140880 T	15-08-1996
		AT 174813 T	15-01-1999
		AU 677780 B	08-05-1997
		AU 4222393 A	29-11-1993
		AU 680195 B	24-07-1997
		AU 4222593 A	29-11-1993
		AU 677781 B	08-05-1997
		AU 4222693 A	29-11-1993
		AU 4222793 A	29-11-1993
		AU 677197 B	17-04-1997
		AU 4223593 A	29-11-1993
		CA 2134474 A	11-11-1993
		CA 2134475 A	11-11-1993
		CA 2134476 A	11-11-1993
		CA 2134477 A	11-11-1993
		CA 2134478 A	11-11-1993
		DE 69303483 D	08-08-1996
		DE 69303483 T	06-02-1997
		DE 69303898 D	05-09-1996
		DE 69303898 T	20-02-1997
		DE 69312483 D	04-09-1997
		DE 69312483 T	12-02-1998
		DE 69319427 D	06-08-1998
		DE 69319427 T	10-12-1998
		DE 69322774 D	04-02-1999
		EP 0637996 A	15-02-1995
		EP 0637997 A	15-02-1995
		EP 0639223 A	22-02-1995
		EP 0637998 A	15-02-1995
		EP 0637999 A	15-02-1995
		ES 2106341 T	01-11-1997
WD 9610747 A	11-04-1996	US 5707799 A	13-01-1998
		CA 2195875 A	11-04-1996
		EP 0783694 A	16-07-1997
		JP 10506991 T	07-07-1998
EP 323829 A	12-07-1989	AU 2613988 A	01-08-1989
		CA 1324100 A	09-11-1993

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/16870

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 323829 A		DK 160290 A	29-08-1990
		EP 0398880 A	28-11-1990
		JP 4505547 T	01-10-1992
		PT 89379 A	08-02-1990
		WO 8906280 A	13-07-1989
		US 5506130 A	09-04-1996
WO 9614933 A	23-05-1996	US 5726026 A	10-03-1998
		US 5744366 A	28-04-1998
		US 5587128 A	24-12-1996
		AU 4236996 A	06-06-1996
		AU 698213 B	29-10-1998
		AU 4282896 A	06-06-1996
		AU 4282996 A	06-06-1996
		CA 2181189 A	23-05-1996
		CA 2181190 A	23-05-1996
		CN 1157639 A	20-08-1997
		CN 1143917 A	26-02-1997
		EP 0739240 A	30-10-1996
		EP 0739423 A	30-10-1996
		JP 9511407 T	18-11-1997
		JP 9509498 T	22-09-1997
		WO 9615269 A	23-05-1996
		WO 9614934 A	23-05-1996
WO 9612541 A	02-05-1996	AT 175362 T	15-01-1999
		AU 695237 B	13-08-1998
		AU 3703095 A	15-05-1996
		AU 699883 B	17-12-1998
		AU 3703195 A	15-05-1996
		CA 2203282 A	02-05-1996
		CA 2203283 A	02-05-1996
		DE 69507157 D	18-02-1999
		EP 0787029 A	06-08-1997
		EP 0790849 A	27-08-1997
		WO 9612540 A	02-05-1996
		JP 10507406 T	21-07-1998
		JP 10507962 T	04-08-1998

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 1/00		C 0 7 H 1/00	
21/00		21/00	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
37/00	1 0 1	37/00	1 0 1
(81) 指定国 F P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M), A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C U, C Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E, G H, G M, H R, H U, I D, I L, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U G, U Z, V N, Y U, Z W			
(72) 発明者	ウィリアム・エイ・マクミラン アメリカ合衆国95014カリフォルニア州ク ペルティノ、プレシディオ・ドライブ8051 番		
(72) 発明者	エム・アレン・ノースロップ アメリカ合衆国94708カリフォルニア州バ ークリー、クレストン・ロード923番		
(72) 発明者	カート・イー・ピーターセン アメリカ合衆国95148カリフォルニア州サ ンノゼ、バレー・リッジ・レイン3655番		
(72) 発明者	ファーザド・ポーラーマディ アメリカ合衆国94539カリフォルニア州フ レモント、パジャロ・ドライブ41013番		
F ターム (参考)	2G042 CB03 CB04 GA01 HA02 4C057 AA10 BB02 DD01 MM02 MM04 4D017 AA11 BA07 DA01 DR02 DR03 DR04 FA05 4G057 AB34 AB38 AD01 AD11 4G075 AA13 BB01 BB04 BD07 BD15 BD16 CA02 CA54 DA01 EB01 EE31 FA02 FR04		

【要約の続き】
せる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.